

Н. И. ГРИНЕВА, Г. Г. КАРПОВА, С. Д. МЫЗИНА, И. ФОДОР,
академик А. А. БАЕВ

**КОМПЛЕМЕНТАРНО АДРЕСОВАННАЯ ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК.
ХИМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ РЕСТРИКЦИИ
С РАСЩЕПЛЕНИЕМ ДНК ВБЛИЗИ ОЛИГОТИМИДИЛОВЫХ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

Развитие методов специфичного расщепления нуклеиновых кислот, необходимых для исследования их структуры и функций, позволило установить первичную структуру многих РНК (¹, ²) и определило создание плодотворных подходов к изучению структуры ДНК (³). Специфичное расщепление ДНК в ряде работ достигается с помощью ферментов рестрикции (³), которые расщепляют ДНК по различным, строго определенным для данного фермента последовательностям в двуспиральных участках длиной в 4–6 нуклеотидов. Так, ДНК фага ϕ X 174 (5000 нуклеотидных пар) можно расщепить на 8–12 или 80–93 фрагментов под действием разных ферментов; из ДНК фага T7 (38 000 пар нуклеотидов) получают ≥ 40 или 77–93 фрагмента (³). Химические методы фрагментации применяются наряду с ферментативными. Но при помощи известных химических методов расщепляют нуклеиновые кислоты по всем или многим основаниям одного-двух видов: апуриновую (⁴, ⁵) или апириимидиновую ДНК (⁶), дезуридиловую РНК (⁷) и ДНК с элиминированными основаниями, например такими, как алкилированные гуанин и аденин (⁸, ⁹) или алкилированный гуанин (химическая имитация «гуанилдезоксирибонуклеазы») (¹⁰).

Для расщепления по нескольким различным последовательностям ДНК (что необходимо для определения структуры) нужны ферменты рестрикции, каждый из которых узнает одну последовательность и по ней расщепляет цепь. Поэтому стратегия секвенсинга в значительной мере определяется свойствами ферментов узнавать определенные последовательности (³).

В данной работе мы установили, что алкилирующие производные олигонуклеотидов способны расщеплять ДНК вблизи участков, комплементарных олигонуклеотидной части реагента; такое расщепление осуществляется через стадии: 1) образования комплекса ДНК — реагент, 2) алкилирования в этом комплексе оснований ДНК (расположенных вблизи участка связывания реагента) и 3) элиминирования из ДНК алкилированных оснований в мягких условиях. Расщепление ДНК с помощью алкилирующих производных олигонуклеотидов имитирует действие ферментов рестрикции с тем выгодным преимуществом, что расщепление алкилирующими производными олигонуклеотидов может программироваться и варьироваться путем изменения олигонуклеотидной составляющей реагента, предоставляя исследователю полную свободу сознательного выбора специфичности (направленности) расщепления ДНК по тому или иному участку молекулы биополимера.

ДНК *Escherichia coli* была выделена из биомассы *E. coli* MRE-600 (Специальное конструкторское технологическое бюро биологически активных веществ, Новосибирск) фенольной депротеинизацией после лизиса клеток лизоцимом и додецилсульфатом Na. Примесь РНК удаляли обработкой пиримидил-РНКазой или щелочью. ДНК селезенки крупного рогатого скота получена с завода химических реактивов (Олайне, Латвийская ССР). ДНК очищали гель-фильтрацией на сефадексе G-100; узкую зону высокополимерного материала центрифугировали в щелочном градиенте плотности сахарозы от 5 до 25%. Зону соответствующих ДНК (48 S ДНК *E. coli* и 8–10 S ДНК селезенки) осаждали спиртом после нейтрализации

фракций. Такие ДНК не содержали примеси РНК и белков. Характеристики ДНК приведены на рис. 2 и в табл. 1.

Денатурированную ДНК алкилировали ^{14}C -2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензилиден]-гексааденилатом, $(\text{Ar})_5\text{ACHRCI}$ (5 мС/ммоль, получен по ⁽¹¹⁾), при 20° в 0,2 М NaCl, 0,01 М MgCl_2 и 0,01 М трис-НСI, рН 7,5 (буфер I), 7 суток. Алкилированную ДНК отделяли от продуктов превращения реагента гель-фильтрацией реакционной смеси на сефадексе G-75 в 0,02 М трис-НСI, рН 7,5, при 45°, когда все комплексы разрушались, а алкилированные основания оставались связанными с ДНК. Степень модификации определяли по радиоактивности фракции ДНК и выражали в молях остатков $(\text{Ar})_5\text{ACHR}$ на 10^4 нуклеотидов ДНК. Согласно ^(11, 12), в этих условиях протекает высокоэффективное алкилирование в комплементарных комплексах. Как видно из зависимости степени модификации ДНК от концентрации реагента (рис. 1), степень модификации растет с увеличением концентрации $(\text{Ar})_5\cdot\text{ACHRCI}$ до присоединения 26 мол. реагента на 10^4 мол. нуклеотидов ДНК. Дальнейшее повышение концентрации реагента не увеличивает степени модификации денатурированных ДНК; т. е. после алкилирования всех участков связывания, образующих продуктивные комплексы, реакция практически останавливается. При алкилировании ДНК $(\text{Ar})_5\text{ACHRCI}$ основная часть реагента расходуется на алкилирование ДНК; такое высокое включение производных олигонуклеотидов в нуклеиновые кислоты наблюдается только в случае протекания реакции в комплексе ⁽¹²⁾. Вне комплекса в реакцию вступает лишь 0,3% реагента, остальная часть расходуется на побочные превращения реагента. Согласно ⁽¹³⁾, эффективность реакции в комплексе на 4 порядка выше, чем в растворе при равных концентрациях реагента. На начальных участках плато (рис. 1) концентрация реагента вне комплекса примерно в 2 раза выше, чем в комплексе. Отсюда число оснований, проалкилированных случайно, составит 0,6% от 26 (0,15 основания). Таким образом, полученная $(\text{Ar})_5\text{ACHR}$ -ДНК содержит алкилированные основания практически только вблизи 5'-концов олиготимидиловых последовательностей $(\text{pT})_n$ (в силу антипараллельности цепей в комплементарных комплексах). Отметим, что число $(\text{pT})_n$ участков, обнаруживаемое при алкилировании $(\text{Ar})_5\text{ACHRCI}$ (26), хорошо согласуется с числом $(\text{pT})_n$ трактов с $n \geq 4$ в ДНК *E. coli* В₂₃, найденным в работе ⁽¹⁴⁾ по методу Бартона ⁽⁴⁾ равным 28 (на 10^4 нуклеотидов ДНК).

Полученную $(\text{Ar})_5\text{ACHR}$ -ДНК для элиминирования алкилированных оснований выдерживали при рН 6,0–6,2 и 60° в течение 12 час. по ⁽¹⁰⁾. Затем ДНК отделяли от отщепившихся оснований гель-фильтрацией при 45° и о степени элиминации судили по радиоактивности. Оказалось, что за 8 час. практически все алкилированные основания (24 из 25 на 10^4 нуклеотидов ДНК) элиминируются из ДНК, и дальнейшее выдерживание результатов не меняет. Это означает, что в комплексах протекает алкилирование главным образом гуанина и аденина ⁽¹⁰⁾. Далее для расщепления цепи по апуриновым участкам ДНК выдерживали в 0,6 N NaOH, 100°, 1 час по ⁽¹⁰⁾ или в глициновом буфере, состоящем из 1 N KCl, 0,05 М трис-НСI, 0,01 М MgCl_2 , 0,0005 М ЭДТА, рН 7,4, 0,05 М глицина, 70°, 18 час. по ⁽⁶⁾. Для определения числа разрывов анализировали число 5'-конце-

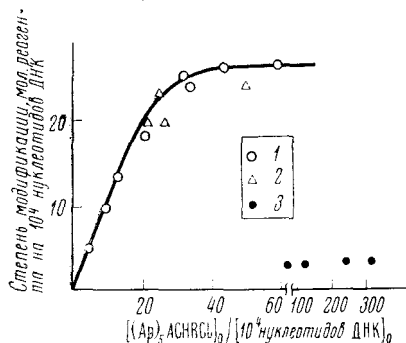


Рис. 1. Зависимость степени модификации ДНК в комплексе с $(\text{Ar})_5\text{ACHRCI}$ от соотношения концентраций компонентов при 20°. 1 — денатурированная 0,3 мМ ДНК *E. coli*; 2 — денатурированная 0,14 мМ ДНК селезенки; 3 — нативная 1,5 мМ ДНК селезенки

агента на 10^4 мол. нуклеотидов ДНК. Дальнейшее повышение концентрации реагента не увеличивает степени модификации денатурированных ДНК; т. е. после алкилирования всех участков связывания, образующих продуктивные комплексы, реакция практически останавливается. При алкилировании ДНК $(\text{Ar})_5\text{ACHRCI}$ основная часть реагента расходуется на алкилирование ДНК; такое высокое включение производных олигонуклеотидов в нуклеиновые кислоты наблюдается только в случае протекания реакции в комплексе ⁽¹²⁾. Вне комплекса в реакцию вступает лишь 0,3% реагента, остальная часть расходуется на побочные превращения реагента. Согласно ⁽¹³⁾, эффективность реакции в комплексе на 4 порядка выше, чем в растворе при равных концентрациях реагента. На начальных участках плато (рис. 1) концентрация реагента вне комплекса примерно в 2 раза выше, чем в комплексе. Отсюда число оснований, проалкилированных случайно, составит 0,6% от 26 (0,15 основания). Таким образом, полученная $(\text{Ar})_5\text{ACHR}$ -ДНК содержит алкилированные основания практически только вблизи 5'-концов олиготимидиловых последовательностей $(\text{pT})_n$ (в силу антипараллельности цепей в комплементарных комплексах). Отметим, что число $(\text{pT})_n$ участков, обнаруживаемое при алкилировании $(\text{Ar})_5\text{ACHRCI}$ (26), хорошо согласуется с числом $(\text{pT})_n$ трактов с $n \geq 4$ в ДНК *E. coli* В₂₃, найденным в работе ⁽¹⁴⁾ по методу Бартона ⁽⁴⁾ равным 28 (на 10^4 нуклеотидов ДНК).

Полученную $(\text{Ar})_5\text{ACHR}$ -ДНК для элиминирования алкилированных оснований выдерживали при рН 6,0–6,2 и 60° в течение 12 час. по ⁽¹⁰⁾. Затем ДНК отделяли от отщепившихся оснований гель-фильтрацией при 45° и о степени элиминации судили по радиоактивности. Оказалось, что за 8 час. практически все алкилированные основания (24 из 25 на 10^4 нуклеотидов ДНК) элиминируются из ДНК, и дальнейшее выдерживание результатов не меняет. Это означает, что в комплексах протекает алкилирование главным образом гуанина и аденина ⁽¹⁰⁾. Далее для расщепления цепи по апуриновым участкам ДНК выдерживали в 0,6 N NaOH, 100°, 1 час по ⁽¹⁰⁾ или в глициновом буфере, состоящем из 1 N KCl, 0,05 М трис-НСI, 0,01 М MgCl_2 , 0,0005 М ЭДТА, рН 7,4, 0,05 М глицина, 70°, 18 час. по ⁽⁶⁾. Для определения числа разрывов анализировали число 5'-конце-

вых фосфатов в фрагментированной, контрольной и исходной ДНК *E. coli* с помощью фосфорилирования γ - ^{32}P -АТФ в присутствии полинуклеотидкиназы по Ричардсону (¹⁵) после предварительного дефосфорилирования проб щелочной фосфомоноэстеразой *E. coli*.

Таблица 1

Определение числа разрывов в ДНК путем анализа 5'-концевых ^{32}P -фосфатных групп фрагментов, полученных из алкилированной в комплексе ДНК *E. coli*, и констант седиментации исследуемых ДНК

Полинуклеотид *	Длина цепи, мол. нуклеотидов на 1 моль ^{32}P	Мол. вес ($\times 10^{-6}$)	S	Число разрывов на 10^4 нуклеотидов ДНК
ДНК <i>E. coli</i>	50000	18,2	48	—
ДНК ₁ контроль	49000	18,0	48	0,1
ДНК ₁ контроль	46000	17,0	46	0,4
ДНК ₁ фрагменты	440		35+26+7	23,0
ДНК ₂ фрагменты	450		35+28+7	22,0
23S РНК	3600	1,3	23	—

* Индексами 1 и 2 обозначены фрагментация и соответствующие контроли в глициновом буфере и щелочи соответственно.

Из табл. 1 видно, что образующиеся фрагменты примерно в 100 раз короче контрольных ДНК, что неспецифичное изменение длины цепи ДНК в контрольных опытах незначительно и что на 10^4 нуклеотидов в цепи ДНК возникает 22—23 разрыва. Итак, $(\text{Ar})_3\text{ACHRCI}$ модифицирует в ДНК 25 из 10^4 нуклеотидов; 24 из них элиминируются в мягких условиях и затем 22—23 апуриновых участка подвергаются расщеплению с образованием фрагментов длиной 450 нуклеотидов в среднем.

О характере образующихся фрагментов судили по данным центрифугирования в щелочном градиенте плотности сахарозы (рис. 2). Расщепление ДНК *E. coli* в глициновом буфере и в щелочи дает близкие результаты: в обоих случаях образуются фрагменты с константами седиментации: 35S, 28S, и 7S. Их содержание по оптической плотности составляет 28, 35 и 37 % соответственно. Выделенные фрагменты связывали с избытком реагента при 0°, комплексы отделяли от свободного реагента гель-фильтрацией при 0° по (¹¹) и по радиоактивности судили о степени связывания. Фрагменты 7S связывают основное количество $(\text{Ar})_3\text{ACHRCI}$ (55 %) в соотношении 1,1 моля реагента на 1 моль фрагментов. Расщепление ДНК селезенки (8S) по апуриновым участкам также дает 3 фракции фрагментов — примерно 6—7S (53 %), 5S (21 %) и менее 4S (26 %).

Совокупность изложенных данных свидетельствует о том, что в результате комплементарно адресованного алкилирования протекает специфичная модификация 5'-концов участков связывания реагента с ДНК, которая после элиминирования алкилированных оснований и расщепления цепи ДНК по пуриновым участкам в мягких условиях ведет к специфичному расщеплению ДНК вблизи олиготимидиловых последовательностей с образованием фрагментов определенной длины; степень алкилирования, глубина апуринизации и число разрывов практически совпадают. Поскольку алкилирование протекает в комплексе и останавливается после модификации 26 участков, можно заключить, что разработанные условия позволяют воспроизводимо фрагментировать ДНК по определенным олиготимидиловым последовательностям. Точность комплементарно адресованной фрагментации должна зависеть от позиционной специфичности алкилирования олигонуклеотидными производными (¹³) и соотношения специфичных и случайных разрывов в условиях опыта. Ошибка в позиционной точности составляет в рассматриваемых условиях 0,03—0,6 %; ошибка за счет случайных разрывов (табл. 1) в контрольной ДНК составляет 0,5 и 1,6 % для реакции в глициновом буфере и в щелочи соответ-

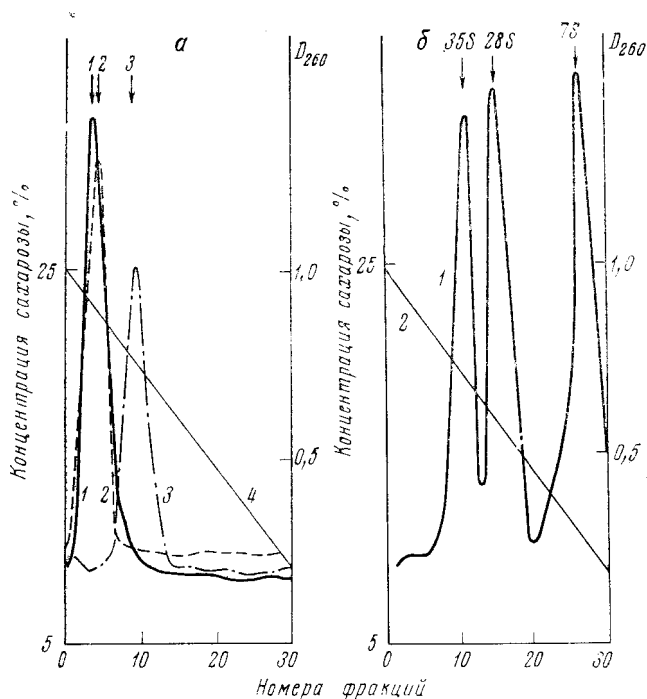


Рис. 2. Профили центрифугирования в щелочном градиенте плотности сахарозы. «Spinco» L-65, ротор S, W-25, 20°, 14 час., объем градиента 30 мл; 25 000 об/мин. а — изменение D_{260} : 1 — исходная ДНК *E. coli*, 48 S; 2 — контроль ДНК₂, 46 S; 3 — ДНК фага Т7, 37 S; 4 — градиент концентрации сахарозы. б — фрагменты ДНК₂ *E. coli*, полученные с помощью расщепления алкилированной в комплексе ДНК: 1 — D_{260} , 2 — градиент концентрации сахарозы

исключает образование комплексов неполного спаривания оснований и уменьшает степень модификации; в удлинении и подборе функционально значимой олигонуклеотидной части реагента.

Таким образом, комплементарно адресованная фрагментация ДНК с помощью алкилирующих производных олигонуклеотидов дополняет арсенал методов расщепления ДНК, позволяя расщеплять однотяжевые ДНК вблизи определенных, сознательно выбираемых последовательностей.

Авторы признательны Г. Т. Бабкиной за предоставление фосфомоноэстеразы, Т. Г. Максимовой — за предоставление фага Т7, В. А. Курбатову, В. Г. Будкеру и А. Н. Чемасовой — за советы и помощь в работе.

Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР
Новосибирский государственный университет
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР
Пущино-на-Оке

Поступило
31 III 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Т. В. Венкстерн, Первичная структура тРНК, М., «Наука», 1970.
- ² P. Fellner et al., *Biochim.*, v. 54, 853 (1972).
- ³ W. A. Salser, *Ann. Rev. Biochim.*, v. 43 (1974).
- ⁴ K. Burton, *Methods in Enzymol.*, v. 12, part A, 222 (1967).
- ⁵ T. A. Lindal, *Biochem.*, v. 11, 3618 (1972).
- ⁶ M. L. Stephenson, P. C. Zamecnik, *Methods in Enzymol.*, v. 12, Part A, 670 (1967).
- ⁷ Н. К. Кочетков, Э. И. Будковский и др., ДАН, т. 152, 1005 (1963); *Biochim. et biophys. acta*, v. 166, 755 (1968).
- ⁸ P. D. Lawley, *Progr. in Nucleic Acid. Res. and Mol. Biol.*, v. 5, 89 (1967).
- ⁹ B. Strauss, T. Hill, *Biochim. et biophys. acta*, v. 123, 14 (1970).
- ¹⁰ А. М. Беликова и др., ДАН, т. 212, 876 (1973).
- ¹¹ N. I. Grineva, G. G. Karpova, *FEBS Letters*, v. 32, 352 (1973).
- ¹² Н. И. Гринева, Г. Г. Карпова, *Моля. биол.*, т. 8, 832 (1974).
- ¹³ Н. И. Гринева, Г. Г. Карпова, *Биоорг. хим.*, № 5 (1975).
- ¹⁴ R. Rudner, M. LeDouz, *Biochem.*, v. 13, 118 (1974).
- ¹⁵ C. C. Richardson, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 54, 158 (1965).

венно. Следовательно, ошибка в специфичности комплементарно адресованной фрагментации 0,5—1,1% в глициновом буфере и 1,6—2,2% в щелочи.

Число разрывов при фрагментации после алкилирования в комплексе (22—23 на 10^4 нуклеотидов ДНК) сопоставимо с глубиной расщепления ДНК фагов ϕ X 174, λ и Т7 ферментами рестрикции (³).

Возможность более избирательной фрагментации ДНК, на наш взгляд заключается в следующем: в проведении реакции с нативной ДНК, в которой с реагентом взаимодействуют (и следовательно, расщепляются) только однотяжевые локусы; в повышении температуры алкилирования, которое