



УДК 547.963.32

НОВЫЙ МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ КОНФОРМАЦИИ ДНК
С ПОМОЩЬЮ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИМазин А. В., Бузьминов А. В., Дианов Г. Л.,
Салганик Р. И.Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск

В последние годы было разработано несколько химических методов изучения конформации ДНК. Эти методы основаны на использовании реагентов, чувствительных к особенностям вторичной структуры ДНК. Так, для изучения конформационных особенностей двухцепочечной ДНК было предложено использовать такие реагенты, как H_2O , HNO_2 , $NaNH_2$ и *N*-бромсукцинимид [1]. Для выявления неспаренных участков в двухцепочечной ДНК использовали реакцию алкилирования диметилсульфатом (ДМС) по *N*-3-атому цитозина, доступному для реакции только в одноцепочечной ДНК [2]. Однако этот метод имеет некоторые недостатки: 1) ДМС взаимодействует с ДНК преимущественно по *N*-7-положению гуанина, а *N*-3 цитозина алкилирует слабо [3]; 2) для расщепления ДНК по алкилированным цитозинам требуется дополнительная стадия обработки гидразином [2].

В настоящей работе для идентификации одно- и двухцепочечных участков в составе молекул ДНК предложено использовать реакцию алкилирования по гуанину с помощью реагентов, дискриминирующих эти структуры. Известно, что алкилирование гуанина проходит преимущественно по *N*-7-атому [3]. *N*-7-атом гуанина не вовлекается в образование водородных связей, поэтому он одинаково доступен для алкилирования такими низкомолекулярными реагентами, как ДМС в одно- и двухцепочечной ДНК [4]. Однако при реакции с более объемными алкилирующими реагентами доступность *N*-7-атома гуанинов в участках спаривания оснований ДНК в составе двухцепочечной ДНК может значительно уменьшаться. Так, нами показано, что скорость взаимодействия такого объемного алкилирующего реагента, как *N*, *N*, *N'*-три(хлорэтил)-*N'*-(*n*-формилфенил)пропилендиамин-1,3 (ТФП) с двухцепочечной ДНК в ~ 2 – $2,5$ раза ниже, чем с одноцепочечной (рис. 1).

Способность ТФП взаимодействовать с пониженной скоростью с двухцепочечной ДНК была использована нами для выявления «шпильчатых» структур, образующихся в составе одноцепочечной ДНК. Для анализа вторичной структуры был выбран *EcoRI* – *Bam*HI-фрагмент ДНК (377 п. о.) из области промотора гена *tel* плазмиды рBR322. Этот фрагмент содержит квазипалиндромную последовательность размером в 19 п. о. на расстоянии 11 п. о. от точки инициации транскрипции [6]. Фрагмент метили ^{32}P по 5'-концам с помощью полинуклеотидкиназы фага T4 и [γ - ^{32}P]АТФ [4]; затем его денатурировали и цепи ДНК выделяли с помощью электрофореза по методу [4]. Палиндромные и квазипалиндромные последовательности в одноцепочечной ДНК способны образовывать «шпильчатые» структуры. Скорость алкилирования гуанинов, входящих в состав шпильки, должна значительно уменьшаться. Полученную цепь ДНК, меченую с 5'-*EcoRI*-конца, алкилировали ТФП. Параллельно эту же цепь ДНК модифицировали ДМС, как это описано в работе [4]. Полученный в результате расщепления по [4] набор фрагментов ДНК, меченных с 5'-конца ^{32}P , разделяли электрофорезом в 15% полиакриламидном геле, содержащем 8 М мочевины. После окончания электрофо-

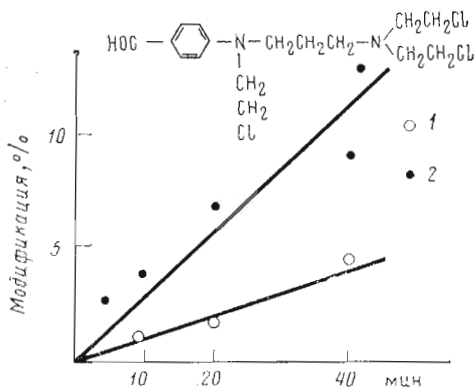


Рис. 1. Кинетика алкилирования N,N,N' -три(β -хлорэтил)- N' -(n -формилфенил)пропилендиамином - 1,3 (ТФП) ДНК фага T7: 1 - нативная ДНК; 2 - ДНК, денатурированная нагреванием. Реакцию проводили при 21°С в растворе, содержащем 0,01 М трис-НСl (рН 7,5), 0,001 М EDTA, 50% метанол, при концентрации ТФП 0,5 мг/мл и ДНК 40-50 мкг/мл. Степень алкилирования определяли как описано в [5]

реза гель подвергали автордиографии [4]. Как видно из рис. 2а, ТФП, как и ДМС, алкилирует остатки гуанинов в ДНК. Однако 3-й и 5-й гуанины с 5'-конца практически не модифицировались ТФП. При рассмотрении нуклеотидной последовательности ДНК видно, что эти остатки гуанинов входят в состав палиндромной последовательности ДНК (рис.

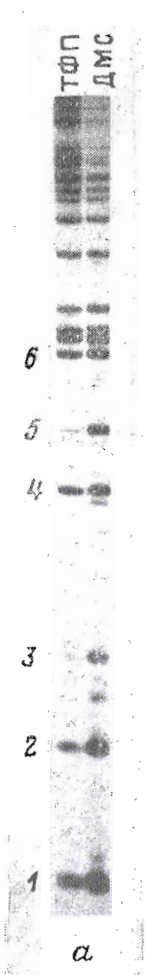
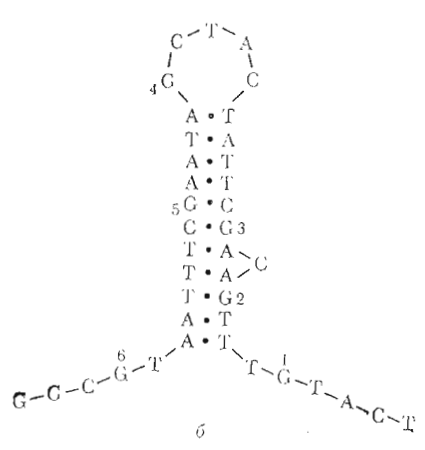


Рис. 2. Модификация ТФП одноцепочечного *EcoRI* - *BamHI*-фрагмента, меченного ^{32}P с 5'-*EcoRI*-конца. Условия модификации см. в подписи к рис. 1. Время реакции ДНК с ТФП 10 мин. В контрольном опыте ДНК модифицировали ДМС [4], расщепление по модифицированным звеньям проводили в 10% пицеридине (100°С, 30-60 мин). Справа приведена вторичная структура ДНК, выявленная с помощью модификации ТФП



2б). Следовательно, алкилирующий реагент ТФП может быть использован для выявления «ипсилечных» участков в одноцепочечной ДНК.

Различия в скорости алкилирования ТФП гуанинов в составе одноцепочечной и двухцепочечной ДНК связаны, вероятно, со стереометрией двухцепочечной ДНК: в составе двойной спирали ДНК экспонированный

большую бороздку атом N-7 гуанина малодоступен для алкилирования объемными алкилирующими реагентами. Можно надеяться, что использование ТФП или его аналогов позволит выявлять расплетенные и петлеобразные участки в составе двухцепочечной ДНК, а также более тонкие особенности конформации ДНК в составе регуляторных участков (промоторов, энхансеров), в транскрипционно активной и репликативной ДНК в составе хроматина.

Авторы выражают благодарность Г. С. Монастырской и Е. Д. Свердлову (ИБХ АН СССР) за обсуждение результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Свердлов Е. Д., Калинин Н. Ф. Докл. АН СССР, 1984, т. 274, № 6, с. 1508–1510.
2. Kirkegaard K., Buc H., Spassky A., Wang J. C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, p. 2544–2547.
3. Lawley P. D. Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol., 1966, v. 5, p. 89–131.
4. Maxam A. M., Gilbert W. In: Methods in enzymol./Eds Grossman L., Moldave K. N. Y.: Acad. Press, 1980, v. 65, P. I, p. 499–560.
5. Дианов Г. Л., Бондарь Т. С., Салганик Р. И. Молекулярн. биология, 1979, т. 13, в. 2, с. 383–387.
6. West R. W., Jr., Rodriguez R. L. Gene, 1982, v. 20, № 2, p. 291–304.

Поступило в редакцию
6.VI.1985

A NEW METHOD FOR STUDYING THE CONFORMATION OF DNA BY CHEMICAL MODIFICATION

MAZIN A. V., KUZMINOV A. V., DIANOV G. L., SALGANIK R. I.

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division of the
USSR Academy of Sciences, Novosibirsk*

A new method of discrimination of double-stranded (ds) and single-stranded (ss) regions in DNA molecules has been developed. It makes use of two alkylating reagents, a voluminous and a small-sized, the former being sensitive to the DNA conformation. A bulky reagent, N,N,N'-tri(β -chloroethyl)-N'-(*p*-formylphenyl)propylendi-amine-1,3 (TFP), was used to detect the hairpin structure in the palindrome-containing DNA fragment 373 nucleotides long prepared from the ds *EcoRI-BamHI* fragment of the plasmid pBR322. The fragment was modified by TFP and cleaved by piperidine at the alkylated guanine residues according to the Maxam – Gilbert procedure. Guanine residues in the hairpin formed by palindrome were protected from the TFP action, while dimethylsulfate modified all guanines. Application of the method for the identification of loops, stem-and-loop structures, and unwinded regions of DNA is discussed.