



УДК 547.963.32

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ДНК ИЗ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ
С ПОМОЩЬЮ БРОМИСТОГО ЦЕТИЛТРИМЕТИЛАММОНИЯ
В СОЧЕТАНИИ С ХРОМАТОГРАФИЕЙ НА ОКСИАПАТИТЕ***Сулимова Г. Е., Дрожденюк А. П., Ванюшин Б. Ф.*

*Межфакультетская лаборатория биоорганической химии
и Биологический факультет Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова*

Предложен быстрый и эффективный метод выделения и очистки препаратов ДНК высших растений путем осаждения нуклеиновых кислот бромистым цетилтриметиламмонием (цетавлоном) (выход 95%) с последующей хроматографией ДНК на гранулированном оксиапатите (выход 98—100%). Полученные описанным методом препараты ДНК очищены от белков, РНК (содержание этих веществ не превышает 1%) и пигментов, обладают высоким гиперхромизмом (32—35%) и являются высокополимерными ($s_{20,w} = 20-21$ S). В полученных препаратах последующее определение состава ДНК (в частности, содержания 5-метилцитозина) возможно только при условии удаления цетавлона двух-трехкратным переосаждением ДНК этанолом из 0,7 M NaCl или стандартного солевого раствора.

Для выделения и очистки нативных препаратов ДНК наиболее часто используются предложенные Мармуром [1] и Кирби [2] методы, существенным этапом которых является депротеинизация ДНК либо смесью хлороформ — изоамиловый спирт [1], либо водонасыщенным фенолом [2]. Однако, как показали наблюдения последних лет, применение описанных методов депротеинизации приводит к ощутимым потерям ДНК. При многократной обработке растворов ДНК хлороформом часть ДНК переходит из водной фазы в интерфазу в виде полностью или частично денатурированных молекул [3—5]. Депротеинизация препаратов ДНК водонасыщенным фенолом связана с потерями фракций, обогащенных А·Т-парами оснований [6, 7].

При выделении ДНК из растений до сих пор нет надежных способов полной очистки их от полисахаридов и пигментов, а используемые для этой цели методы, как правило, также приводят к значительным потерям ДНК. Так, Энглу и Уорду [8] удалось получить относительно чистые препараты ДНК из *Vicia faba* переосаждением ДНК 2-метоксиэтанолом, но потери при этом составили более 80%. Достаточно перспективен метод очистки препаратов ДНК на колонках с оксиапатитом [9, 10], предложенный Бриттеном с сотр. [9], однако при использовании этого метода необходимо последующее освобождение растворов ДНК от фосфатов.

Для выделения и очистки нуклеиновых кислот широко применяется цетавлон (бромистый цетилтриметиламмоний) [11—15], способный осаждать полианионы из солевых растворов. Изменение условий осаждения и последующего растворения осадка цетавлоновых солей можно исполь-

зовать для фракционирования полианионов в зависимости от величины их заряда. Это делает метод осаждения цетавлоном удобным и перспективным для разделения белков, полисахаридов, нуклеиновых кислот, в том числе и для выделения ДНК.

Целью настоящей работы была разработка оптимальной методики для получения высокоочищенных препаратов ДНК из растений. Наиболее перспективным подходом, на наш взгляд, является очистка ДНК осаждением цетавлоном с последующей хроматографией препаратов, содержащих ДНК, на колонках с гранулированным оксиапатитом.

Очистка ДНК осаждением цетавлоном. При осаждении ДНК из клеточного экстракта (после лизиса и удаления додецилсульфата — «супернатант») содержащего также РНК, белки, примеси полисахаридов и других соединений, мы обычно добавляли цетавлон из расчета 4 мг цетавлона на 1 мг суммарных нуклеиновых кислот клеточного экстракта. Выпавший осадок, содержащий ДНК, РНК, белки и примеси других соединений, отделяли центрифугированием и растворяли в 0,7 М NaCl (pH 8—8,5). Белки, значительная часть полисахаридов и часть пигментов в этих условиях нерастворимы, а ДНК переходит в раствор полностью. В результате уже на этой стадии удавалось достигнуть значительной степени очистки ДНК (табл. 1). По спектральным характеристикам ДНК, выделенная однократным осаждением цетавлоном (препараты 1 и 2, табл. 1), близка к ДНК, полученной после шести депротенизаций смесью хлороформ — изоамиловый спирт по методу Мармура (препарат 3, табл. 1). Выход ДНК при этом (для препаратов 1 и 2) был в 1,5 раза выше, чем для препарата 3.

Повторное осаждение ДНК цетавлоном увеличивает степень ее чистоты, причем показано, что осаждение из 0,55 М NaCl (препарат 4, табл. 1) дает лучшие результаты, чем осаждение из более разбавленного (0,25 М NaCl) солевого раствора (препарат 5, табл. 1). При этом кроме освобождения от белков и полисахаридов (контроль $D_{260/280}$ и $D_{260/230}$) достигается также высокая степень очистки ДНК от примеси РНК [15] (содержание РНК < 3%). Спектральные характеристики ДНК, переосажденной цетавлоном из 0,55 М NaCl (препарат 4, табл. 1) практически не отличаются от значений, полученных для чистых ДНК, например, в работе [8].

Хроматография ДНК-содержащих препаратов на гранулированном оксиапатите. Обычно для выделения и очистки ДНК используют оксиапатит, синтезированный по методу Тизелиуса и др. [16]. Нами был ис-

Таблица 1

Спектрофотометрические характеристики и выход ДНК, выделенной из зародышей пшеницы и очищенной различными способами*

Препарат ДНК	Величины отношения			Выход ДНК, мг
	D_{260}/D_{280}	D_{260}/D_{230}	D_{260}/D_{250}	
1	1,40	1,77	1,20	18
2	1,66	1,67	1,18	17
3	1,68	1,63	1,24	11
4	1,80	2,02	1,11	17
5	1,77	1,86	1,09	17
6	1,90	2,08	1,08	17
7	1,99	2,16	1,07	17

* В таблице приведены средние значения из трех параллельных определений. Препараты 1—7 выделены из равных объемов одного и того же клеточного экстракта. Во всех случаях осадок цетавлоновой соли ДНК растворяли в 0,7 М NaCl и снимали спектр на спектрофотометре Hitachi. (Получение препаратов см. в «Экспериментальной части».)

пользован гранулированный оксиапатит, синтез которого описан Мазиным и др. [17, 18]. Гранулированный оксиапатит обладает такой же емкостью, как и обычный оксиапатит, но не уплотняется в колонку, что позволяет вести элюцию со скоростью до 200 мл/ч. При этом нативная высокополимерная ДНК элюируется с колонок полностью, в то время как на обычном оксиапатите ее потери составляют до 40% [19].

Нами был несколько модифицирован сам процесс хроматографии. Во-первых, перед нанесением на колонку клеточный лизат обязательно освобождали от примесей центрифугированием. Во-вторых, образец наносили на колонку в условиях, когда белки, РНК и некоторые другие соединения практически не адсорбировались гранулированным оксиапатитом, а именно в присутствии 0,16 М натрий-фосфатного буфера*. Это позволяло более эффективно использовать емкость колонки. ДНК, элюированная далее с колонки 0,4 М буфером А, имела хорошие спектрофотометрические параметры (препарат 6, табл. 1). В большинстве случаев удавалось также достичь практически полной очистки ДНК от полисахаридов и пигментов, хотя в некоторых препаратах оставалась небольшая часть этих примесей, которые, как правило, не удаляются и другими методами [20]. Исключение составляет ультрацентрифугирование ДНК в градиенте плотности CsCl, однако метод неудобен для выделения и очистки препаративных количеств ДНК.

Вместе с тем выделение ДНК хроматографией на колонках с гранулированным оксиапатитом непосредственно из клеточного экстракта имеет некоторые неудобства. Во-первых, клеточный экстракт, полученный из растительных объектов, как правило, обладает высокой вязкостью и перед нанесением на колонку его приходится сильно разводить, что увеличивает время нанесения образца. Во-вторых, присутствие в экстракте большого количества примесей, загрязняющих ДНК, требует длительной отмывки их 0,16 М буфером А, содержащим 1 М NaCl. Поэтому хроматографию на колонках с гранулированным оксиапатитом мы использовали как окончательный этап очистки ДНК, полученной с помощью цетавлона (препарат 4 → препарат 7). Таким образом, для препаративного выделения ДНК можно рекомендовать методику получения препарата 7.

Определение нуклеотидного состава ДНК, очищенной осаждением цетавлоном. Недавно появилось сообщение, что осаждение ДНК цетавлоном приводит к ошибкам при определении в ней остатков 5-метилцитозина за счет модификации этого основания и изменения его хроматографических свойств [21]. Нами была предпринята попытка выяснить, всегда ли после переведения цетавлоновой соли ДНК в натриевую соль часть цетавлона остается связанной с ДНК и мешает последующему спектрофотометрическому определению 5-метилцитозина после кислотного гидролиза ДНК и хроматографического разделения оснований.

Для решения этой задачи были опробованы различные способы переведения цетавлоновой соли ДНК в натриевую соль. В каждом препарате затем было определено содержание азотистых оснований, в том числе и 5-метилцитозина. В качестве контроля использовали ДНК зародышей пшеницы, выделенную и очищенную по методу Мармура [1] (табл. 2, контроль). Для переведения цетавлоновой соли ДНК в натриевую соль ее либо суспензировали в 70% этаноле, содержащем 0,1 М ацетат натрия, по методу Джонса [11, 12], либо переосаждали ДНК этанолом (от одного до трех раз) из растворов, содержащих ионы натрия.

Содержание 5-метилцитозина в контрольной ДНК и в препаратах, максимально очищенных от возможных примесей цетавлона (два и три переосаждения этанолом), оказалось совершенно одинаковым (препараты 4 и 5, табл. 2). Следовательно, обработка ДНК цетавлоном не оказывает влияния на последующее определение содержания в ней 5-метилцитози-

* Натрий-фосфатный буфер — буфер А.

Нуклеотидный состав препаратов ДНК зародышевой пшеницы, осажденных цетавлоном и затем переведенных в натриевую соль различными способами *

Препарат ДНК	Число опытов	Молярное содержание азотистых оснований, %					5MeCyt/ Gyt +5MeCyt	Ade;Thy
		Ade	Thy	Gua	Cyt	5MeCyt		
Контроль	4	25,7±0,2	25,6±0,2	24,3±0,1	18,6±0,3	5,8±0,1	0,238	1,00
1	3	26,9±0,1	22,6±0,3	25,7±0,4	19,5±0,1	5,4±0,1	0,217	1,19
2	4	28,0±0,2	22,0±0,1	25,8±0,2	19,0±0,3	5,2±0,1	0,215	1,27
3	10	27,1±0,4	23,8±0,4	24,5±0,4	19,1±0,1	5,5±0,1	0,224	1,14
4	3	25,6±0,3	25,5±0,2	24,4±0,3	18,7±0,2	5,8±0,1	0,237	1,00
5	3	25,4±0,4	25,5±0,3	24,3±0,2	18,9±0,3	5,9±0,1	0,238	1,00

* Получение препаратов см. в «Экспериментальной части».

Таблица 3

Спектральные характеристики оснований ДНК в 0,1 н. HCl

Основания	Спектральные характеристики			$\lambda_{\text{макс}}$	$\lambda_{\text{мин}}$
	D_{230}/D_{260}	D_{230}/D_{290}	D_{230}/D_{260}		
X	0,57	1,65	1,22	280	241
5-Метилцитозин	0,42	2,47	2,26	283	242
Тимин	0,67	0,53	0,12	264	233

на, если цетавлон был достаточно хорошо удален из препарата. При одном переосаждении этанолом (препарат 3, табл. 2), переведении цетавлоновой соли ДНК в натриевую соль по методу Джонса (препарат 1, табл. 2) или использовании для гидролиза цетавлоновой соли ДНК (препарат 2, табл. 2) нами были получены заниженные количества 5-метилцитозина (табл. 2). Дефицит его в препарате 2 составлял 12%, а в препарате 1—8% от общего количества в них 5-метилцитозина по сравнению с контрольной ДНК. Эти данные вполне сопоставимы с результатами, полученными Каттерманом для ДНК хлопчатника (дефицит 5-метилцитозина в ДНК в этом случае ~12% [24]). Однако в отличие от его данных в препаратах 1 и 2 (табл. 2) нами был установлен также заметный дефицит тимина (~20%). Кроме того, при хроматографии гидролизатов этих препаратов ДНК обнаруживалось дополнительное соединение X (табл. 3), которое имело хроматографическую подвижность, среднюю между подвижностями 5-метилцитозина и тимина. Содержание соединения X в гидролизатах ДНК относительно невелико: не более 0,15 OE_{280} при содержании цитозина 3,0—3,5 OE_{278} . Не исключено, что это одно из тех производных 5-метилцитозина, о возможном образовании которых пишет Каттерман [24]. Однако, на наш взгляд, взаимодействие цетавлона с азотистыми основаниями ДНК не столь специфично, так как после освобождения от ионов цетавлона в составе ДНК не происходит никаких изменений и, в частности, на хроматограммах не обнаруживается дополнительного основания и не отмечается уменьшения содержания 5-метилцитозина в анализируемых ДНК (табл. 2).

Известно, что ДНК, полученная осаждением цетавлоном, обладает пониженной трансформирующей активностью [25], что, по-видимому, также связано с присутствием в препарате следовых количеств цетавлона, так как для перевода цетавлоновой соли ДНК в натриевую соль был использован метод Джонса [41].

Описанный метод применялся нами в качестве стандартного для получения и очистки растительных ДНК из самых разных объектов (*Triticum*,

vulgare, *Vicia faba*, *Vicia sativa*, *Ginkgo biloba* и др.). Во всех случаях удавалось добиться высокой степени очистки препаратов. Для ДНК, выделенной этим методом из *Vicia faba*, $D_{260}/D_{280} = 1,96$, $D_{260}/D_{230} = 2,23$. Эти значения практически не отличаются от отношений, полученных для ДНК из *Vicia faba*, очищенной 2-метоксиэтанолом ($D_{260}/D_{280} = 1,88$, $D_{260}/D_{230} = 2,25$) [8]. Те же отношения для ДНК, выделенной из этого объекта по методу Мармура, составляли 1,61 и 1,7 соответственно.

Экспериментальная часть

В работе использовали ДНК зародышей пшеницы. ДНК осаждали цетавлоном (Chemapol, Чехословакия), спектры снимали на спектрофотометре (Hitachi, Япония). Профили элюции регистрировали на УФ-денситометре конструкции радиоэлектронного отдела Лаборатории биоорганической химии МГУ при длине волны 254,7 нм. Гранулированный оксиапатит был синтезирован по методу Мазина и др. [17, 18]. Для ТСХ использовали целлюлозу (Filtrak, ГДР).

Получение клеточного экстракта. Для выделения ДНК использовали зародыши пшеницы *Triticum vulgare*, обезжиренные многократной экстракцией эфиром и высушенные на воздухе. Сухие зародыши (20 г) растирали в ступке до получения тонкого порошка, прибавляли 200 мл раствора 0,15 М NaCl, содержащего 0,015 М цитрат натрия и 0,01 М этилендиаминтетраацетат натрия (рН 8,5—9), и тщательно перемешивали. К суспензии добавляли 10% раствор додецилсульфата натрия до конечной концентрации 2% и прогревали 10—15 мин при 60°. К полученному лизату прибавляли 5 М NaCl до конечной концентрации соли 1 М и центрифугировали при 16 000 g 20 мин. В супернатанте определяли количество нуклеиновых кислот по методу Спирина [22]. ДНК из супернатанта получали тремя способами: 1) осаждением цетавлоном; 2) методом Мармура (препарат 3, табл. 1); 3) хроматографированием полученного экстракта на колонках с гранулированным оксиапатитом.

Осаждение ДНК цетавлоном. Готовили исходный водный раствор цетавлона с концентрацией 10 мг/мл. Перед осаждением ДНК из клеточного экстракта осаждали додецилсульфат натрия (который выпадает в осадок при прибавлении цетавлона) 5 М раствором ацетата калия, прибавляя его до конечной концентрации 1 М. Иногда ацетат калия добавляли постепенно до прекращения образования осадка. В обоих случаях были получены аналогичные результаты. Выпавший осадок отделяли центрифугированием (15 мин, 16 000 g) и затем осаждали ДНК из полученного супернатанта цетавлоном двумя способами: а) разбавленным раствором цетавлона (раствор цетавлона предварительно разбавляли водой таким образом, чтобы объем раствора цетавлона был равен тройному объему супернатанта) (препарат 1, табл. 1); б) супернатант до осаждения ДНК разводили водой в 4 раза для снижения ионной силы раствора (препарат, 2, табл. 1). Раствор цетавлона медленно при постоянном перемешивании приливали к раствору, содержащему ДНК. Количество цетавлона, необходимое для осаждения ДНК, рассчитывали из соотношения 4 мг цетавлона на 1 мг суммарных нуклеиновых кислот [23]. Осадок цетавлоновой соли ДНК отделяли центрифугированием (16 000 g, 15 мин), растворяли в 0,7 М NaCl (рН 8—8,5), отделяли нерастворившийся осадок и затем переосаждали ДНК цетавлоном после разведения до концентрации NaCl 0,55 или 0,25 М (соответственно препараты 4 и 5, табл. 1). Выход ДНК при осаждении цетавлоном составлял ~95%.

Очистка препаратов ДНК на колонках с гранулированным оксиапатитом. Гранулированный оксиапатит готовили по методу Мазина и др. [17, 18]. Для очистки препаративных количеств ДНК (~20 мг) использовали колонки размером 2,5 × 40 см. Колонки уравнивали 0,16 М буфером А (рН 6,8), содержащим 1 М NaCl. Перед нанесением на колонку

к клеточному экстракту (после удаления додецилсульфата натрия) добавляли 1 М буфер А до конечной концентрации 0,16 М. РНК, белки и другие примеси элюировали 0,16 М буфером А, содержащим 1 М NaCl (до исчезновения поглощения при 254,7 нм), и пропускали не менее двух объемов 0,18 М буфера А для удаления избытка солей. ДНК элюировали 0,4 М буфером А и осаждали прибавлением исходного раствора цетавлона из расчета 4 мг цетавлона на 1 мг ДНК (препарат 6, табл. 1). Препарат 7 получали растворением препаратов 4 в 0,7 М NaCl (рН 8—8,5), добавлением в раствор 1 М буфера А до конечной концентрации 0,16 М и дальнейшей хроматографией на колонках с гранулированным оксипатитом, как описано выше. ДНК, элюированную с колонки 0,4 М буфером А и осажденную цетавлоном (препараты 6 и 7, табл. 1), растворяли в 0,7 М NaCl (рН 8—8,5), осаждали двойным объемом этанола, переосаждали еще один или два раза этанолом из стандартного солевого раствора (0,15 М NaCl, с 0,015 М цитратом натрия), промывали два раза 70% этанолом и хранили на холоду в 80% этаноле.

Колонки регенерировали, пропуская 0,75 М буфер А (не менее двух объемов колонки), промывали 10-кратным объемом 0,01 М буфера А и уравнивали 0,16 М буфером А.

Определение нуклеотидного состава ДНК. Нуклеотидный состав определяли в препаратах 1—5, используя в качестве контроля ДНК, полученную по методу Мармура [1] (табл. 2). Препарат 1 — цетавлоновую соль ДНК переводили в натриевую соль по методу Джонса; препарат 2 — цетавлоновая соль ДНК; препараты 3, 4, 5 — соответственно одно-, двух- и трехкратное переосаждение цетавлоновой соли ДНК этанолом из раствора, содержащего ионы натрия. Осадок ДНК промывали дважды 70% этанолом, два раза 96% этанолом, смесью спирт — эфир (1 : 1) и эфиром и высушивали при 105°. Высушенную ДНК гидролизовали до оснований 72% HClO₄ (100°, 1 ч). Основания разделяли с помощью ТСХ в системе изопропанол — конц. HCl — вода (170 : 45 : 35), зоны оснований элюировали 0,1 н. HCl и определяли спектрофотометрически. Оптическую плотность 5-метилцитозина измеряли при 290 и 320 нм и рассчитывали его количество в соответствии с равенством: мкмоль/мл 5-метилцитозина равно $0,1136 \times (D_{290} - D_{320})$ [24]. Использованный метод расчета 5-метилцитозина и четкое разделение оснований методом ТСХ позволили избежать рехроматографии 5-метилцитозина, приводящей к его потерям.

ЛИТЕРАТУРА

1. Marmur J. (1961) *J. Mol. Biol.*, 3, 208—218.
2. Kirby K. S. (1956) *Biochem. J.*, 64, 405—408.
3. Morgan A. R., Wells R. D. (1968) *J. Mol. Biol.*, 37, 63—80.
4. Алексина Р. П., Пикер Е. Г., Лихтенштейн А. В. (1973) *Биохимия*, 38, 779—784.
5. Алексеев В. Г., (1973) в сб. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*, 52, вып. 1, 46—56.
6. Skinner D. M., Triplett L. L. (1967) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 28, 892—895.
7. Bhorjee J., Janion C., Laskowski M. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, 262, 11—17.
8. Engle J. B., Ward O. G. (1974) *J. Biochem.*, 75, 205—209.
9. Britten R. J., Pavich M., Smith J. (1969) *Carnegie Inst. Year Book*, 400—403.
10. Markov G. G., Ivanov I. G. (1974) *Anal. Biochem.*, 59, 555—563.
11. Jones A. S. (1951) *Chem. Ind.*, 1067—1069.
12. Jones A. S. (1953) *Biochim. et biophys. acta*, 10, 607—612.
13. Bellamy A. R., Ralph R. K. (1968) in *Methods in Enzymology* (Colowick S. P., Kaplan N. O., eds.), XII, part B, pp. 156—160, Acad. Press, N. Y.—London.
14. Dutta S. K., Jones A. S., Stacey M. (1953) *Biochim. et biophys. acta*, 10, 613—622.
15. Hönig W., Zahn R. K. (1973) *Anal. Biochem.*, 55, 34—50.
16. Tiselius A., Hjerten S., Levin Ö. (1956) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 65, 132—155.
17. Masin A. L., Sulimova G. E., Vanyushin B. F. (1974) *Anal. Biochem.* 61, 62—71.
18. Мазин А. Л., Сулимова Г. Е. (1975) *Биохимия*, 40, 115—122.
19. Bernardi G. (1969) *Biochim. et biophys. acta*, 174, 423—448.
20. Сулимова Г. Е., Слюсаренко А. Г. (1972) в сб. *Структура ДНК и положение организмов в системе*, с. 19—34, Изд-во МГУ.

21. Katterman F. R. H. (1975) Anal. Biochem., 63, 156—160.
22. Спирин А. С. (1958) Биохимия, 23, 656—662.
23. Мирзабеков А. Д., Крутилина А. И., Горшкова В. И., Баев А. А. (1964) Биохимия, 29, 1158—1162.
24. Васильев В. К., Гарибян Д. В., Захарян Р. А., Галоян А. А., Вапюшнн Б. Ф. (1972) Докл. АН СССР, 205, 721—723.
25. Beck G., Schneider M. M., Aubel-Sadron G. (1964) Compt. Rend. Acad. Sci., Ser: D, 259, 925—927.

Поступила в редакцию
24.XI.1975

После переработки
23.III.1976

**ISOLATION AND PURIFICATION OF DNA FROM HIGHER PLANTS
BY MEANS OF CETYLTRIMETHYLAMMONIUM BROMIDE TREATMENT IN
CONJUNCTION WITH HYDROXYAPATITE CHROMATOGRAPHY**

SULIMOVA G. E., DROZHDENYUK A. P., VANYUSHIN B. F.

*Laboratory of Bioorganic Chemistry and Department of Molecular
Biology, M. V. Lomonosov State University, Moscow*

A rapid and effective method for isolation and purification of DNA from higher plants has been suggested which involves precipitation of nucleic acids by cetyltrimethylammonium bromide (cetavlonе) in a 95% yield followed by chromatography on granulated hydroxyapatite (98-100% yield). The DNA preparations thus obtained contain less than 1% of protein and RNA admixtures and are more or less free from pigments; they possess high hyperchromicity (32-35%) and high molecular weight ($s_{20,w} = 20-24$ S). A subsequent analysis of DNA composition (in particular, determination of 5-methylcytosine) may be performed, provided cetavlonе is removed by 2 or 3 ethanol precipitations of DNA from 0.7 M NaCl or standard saline solutions.
