



УДК 547.963.32.04

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЦИТИДИНОВЫХ
И УРИДИНОВЫХ ЗВЕНЬЕВ В ДНК

Свердлов Е. Д., Пак В. И., Монастырская Г. С.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Предложен метод локализации цитидиновых звеньев в ДНК и уридиновых звеньев в урацилсодержащих ДНК. Метод основан на специфическом удалении оснований урацила из ДНК N-урацилгликозидазой. Меченные по концам урацилсодержащие фрагменты ДНК обрабатывали N-урацилгликозидазой и затем расщепляли пиперидином по образовавшемуся дезоксирибозному звену. Длины полученных таким образом ^{32}P -меченных по концам фрагментов ДНК сравнивали с длинами продуктов, полученных в результате других специфических расщеплений исходной ДНК по Максому — Гилберту. Данный метод может быть использован для локализации цитидиновых звеньев в ДНК после их неполного дезаминирования.

Анализ последовательности ДНК в настоящее время осуществляется двумя основными методами: методом химической дегградации по Максому — Гилберту [1] и ферментативным методом прерванной репарации по Сэнгеру [2]. Оба эти метода хороши для определения первичной структуры ДНК, но мало пригодны для исследований, когда требуется определить функциональную значимость определенных нуклеотидных звеньев в регуляторных участках ДНК. Для определения положения таких звеньев необходимы следующие условия:

1) возможность неполной статистической модификации или замены гетероциклических оснований в меченных по одному из концов фрагментах ДНК, которые могут приводить к изменению функции исследуемого участка, например к изменению способности его комплексообразования с белком;

2) возможность отделения фрагментов ДНК, содержащих участки с измененными вследствие модификации функциональными свойствами, от фрагментов, сохранивших исходную функциональную активность;

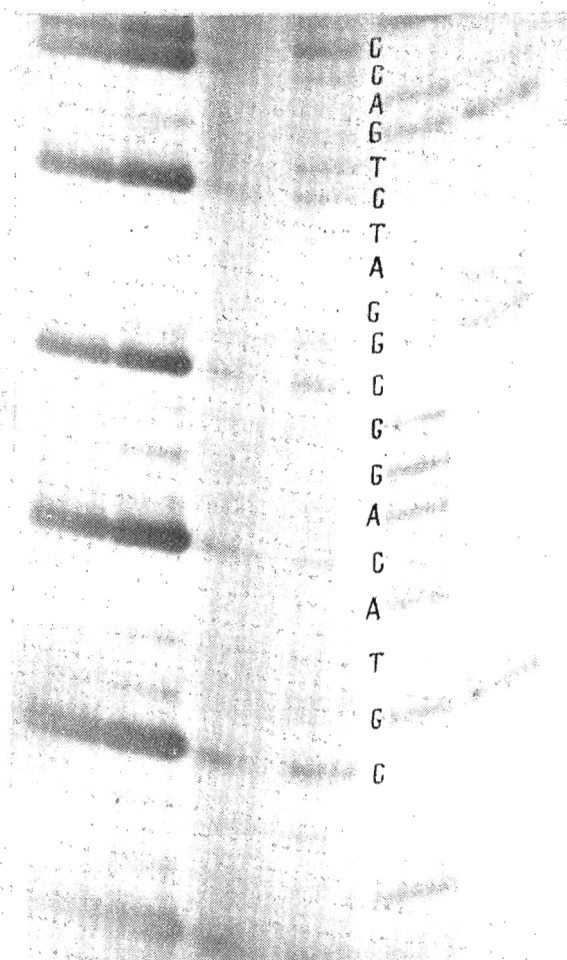
3) возможность расщепления тех и других фрагментов ДНК по измененным звеньям и определения положений этих звеньев в молекуле путем сопоставления длин меченных по концам фрагментов. Фрагменты ДНК с измененной функциональной активностью вследствие модификации звеньев в положениях, наиболее существенных для ее проявления, при расщеплении будут давать ^{32}P -концевые субфрагменты, количество которых будет соответствовать числу функционально важных звеньев, а длины — определять положение этих звеньев в исходном фрагменте.

Очевидно, что чем шире диапазон методов, обеспечивающих соблюдение таких условий, тем большая информация о структурно-функциональных взаимоотношениях в регуляторных участках ДНК может быть получена.

К сожалению, доступные в настоящее время методы модификации довольно ограничены — в основном это метилирование оснований диметилсульфатом [3], которое позволяет оценить роль остатков аденозина и гуанозина, точнее, их N(3)- и N(7)-группы при взаимодействии с белками.

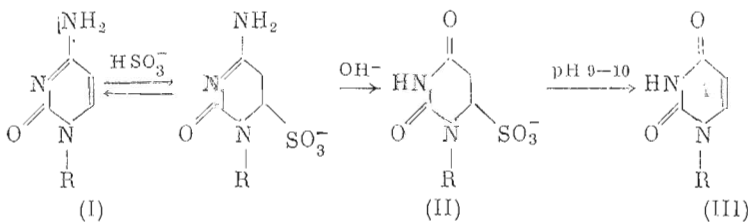
В данной работе предлагается метод, который может быть полезен для определения функциональной значимости остатков цитидина в ДНК. О его применении для определения функционально значимых G·C-пар в промоторах для РНК-полимеразы *E. coli* мы сообщали ранее. Для этой цели использовали урацил-N-гликозидазу *E. coli*, которая специфически удаляет из ДНК урацильные остатки [4, 5], образующиеся после неполного превращения цитидиновых звеньев в уридиновые при специфическом дезамини-

1. HSO_3^-
 2. урацил-N-гликозидаза



Радиоавтограф электрофоретически разделенных продуктов, полученных в результате обработки N-урацилгликозидазой частично дезаминированных ^{32}P -меченных по 5'-концам фрагментов ДНК и продуктов неполного химического расщепления тех же фрагментов модифицированным методом Максама – Гилберта [8]. Разделение в 10% полиакриламидном геле

ровании с помощью бисульфита [6, 7]. Урацил-ДНК-гликозидазы найдены в различных бактериальных клетках. Они специфически удаляют урацил из одно- и двухцепочечных ДНК, оставляя в цепи свободное дезоксирибозное звено [4, 5]. Мы использовали это свойство фермента для локализации цитидиновых звеньев в ДНК. Известно, что в растворах, содержащих ионы бисульфита HSO_3^- , производные цитозина (I) постепенно дезаминируются. При этом образуются производные 5,6-дигидро-6-сульфоурацила (II), которые стабильны только в нейтральной среде, а в слабощелочной легко



превращаются в соответствующие производные урацила в результате отщепления сульфогруппы (III). Эта реакция была детально изучена для мономерных производных цитозина — нуклеотидов и нуклеозидов. Мы исследовали эту реакцию для ДНК и показали, что статистическая модификация 1—2% цитидиновых звеньев происходит в условиях, описанных в «Экспериментальной части». После модификации одноцепочечных меченых по концам фрагментов ДНК и удаления урацильных остатков N-урацилгликозидазой такой полидезоксирибонуклеотид расщепляли по образцованному свободному дезоксирибозному звену пиперидином. Для определения положения удаленных оснований в ДНК продукты расщепления подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле по методу [1]. Полученные результаты представлены на рисунке в сравнении с результатами разделения продуктов специфических химических расщеплений исходной ДНК по другим основаниям [4, 8]. Как видно из рисунка, N-урацилгликозидаза удаляет из ДНК звенья, соответствующие цитидину. Практически равномерное распределение радиоактивности между продуктами расщепления ДНК различной длины указывает на статистический характер дезаминирования, с одной стороны, и расщепления N-урацилгликозидазой — с другой.

Известно, что N-урацилгликозидаза не активна на коротких дезоксирибонуклеотидах [5]. Возможно, это связано с необходимостью определенного пространства для ее посадки. Можно предположить, что несколько концевых звеньев будут недоступны для действия фермента. Однако в наших экспериментах расщепление наблюдалось практически с первых звеньев фрагмента ДНК.

Очевидно, что N-урацилгликозидаза может быть использована для секвенирования природных урацилсодержащих ДНК. Из наших работ по секвенированию фрагмента ДНК бактериофага *λ imm434* [8] и оперона *proV E. coli* [9, 10] следует, что использование реакции гидразинолиза для локализации цитидиновых и тимидиновых звеньев в ДНК часто ненадежно, поэтому предлагаемый метод может быть использован как дополнение к основным реакциям специфического химического расщепления ДНК.

Экспериментальная часть

В качестве источника ДНК в работе использовали *EcoRI*-фрагмент *proVC* оперона *E. coli* (2,8%), первичная структура которого была установлена нами ранее [10]. После гидролиза указанного фрагмента ДНК различными рестрикционными эндонуклеазами смесь субфрагментов фосфорилировали и подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле [1]. Комплементарные цепи индивидуальных меченых субфрагментов разделяли в полиакриламидном геле по методу [11]. Урацил-ДНК-гликозидазу *E. coli* выделяли по методу [4]. Фрагмент с уд. акт. 0,15 ед./мг был свободен от неспецифических эндо- и экзонуклеаз и использовался в концентрации 0,05 ед./мл. Для определения удельной активности фермента с помощью ДНК-полимеразы бактериофага T4 синтезировали ДНК, содержащую [³H]уридиновые звенья вместо тимидина. Для этого ДНК тимуса теленка обрабатывали ультразвуком, денатурировали и использовали в качестве матрицы для ДНК-полимеразы бактериофага T4. Реакционная смесь (v 1 мл) содержала 0,067 М трис; 0,0067 М MgCl₂; 0,001 М дитиотреит; 0,0167 М (NH₄)₂SO₄; 0,0067 М EDTA, pH 8,6; 0,33 мМ dATP, dGTP, dCTP, [³H]dUTP со специфической активностью 0,6 Ки/моль. Синтез вели 1,5 ч при 37° С. После реакции раствор ДНК подвергали гель-филтрации на колонке сефадекса G-50 (2×20 см). Далее использовали высокомолекулярную фракцию ДНК. Полученная ДНК обладала удельной радиоактивностью 1,3 Ки/г. Дезаминирование одноцепочечных ³²P-меченых ДНК проводили 1,5 М метабисульфитом натрия при pH 6,0. Для этого сухой образец растворяли в 15 мкл воды, добавляли 45 мкл 2 М Na₂S₂O₅, pH 6,0, и смесь инкубировали 2 ч при 37° С. Затем pH доводили до 10 концентрированным NaOH, добавляли 20 мкг тРНК и диализовали ночь против воды. К раствору добавляли 1/10 объема 700 мМ HEPES — KOH (pH 7,8), 10 мМ EDTA,

10 мМ дитиотрепт. После добавления 5 мкл N-урацилгликозидазы смесь инкубировали 30 мин при 37° С. Образец обрабатывали фенолом, эфиром, осаждали спиртом и расщепляли пиперидином. Локализацию оснований в ДНК проводили по методу [1] с модификациями [8].

ЛИТЕРАТУРА

1. Maxam A. M., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560-564.
2. Sanger F., Coulson A. R. FEBS Lett., 1978, v. 87, № 1, p. 107-110.
3. Siebenlist U., Simpson A. R., Gilbert W. Cell, 1980, v. 20, № 2, p. 269-281.
4. Lindahl T. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, № 9, p. 3649-3653.
5. Lindahl T., Ljungquist S., Siegrt W., Nyberg B., Sperens B. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 10, p. 3286-3294.
6. Hayatsu H., Wataya Y., Kai K. J. Amer. Chem. Soc., 1970, v. 92, № 3, p. 724-726.
7. Shapiro R., Servis R. E., Welcher M. J. Amer. Chem. Soc., 1970, v. 92, p. 422-424.
8. Ovchinnikov Yu. A., Guryev S. O., Krayev V. M., Monastyrskaya G. S., Skryabin K. G., Sverdlov E. D., Zakharyev V. M., Bayev A. A. Gene, 1979, v. 6, № 3, p. 235-249.
9. Овчинников Ю. А., Сverdlov E. D., Липкин В. М., Monastyrskaya G. S., Чертов О. Ю., Губанов В. В., Гурьев С. О., Модянов П. П., Гришкевич В. А., Макарова И. А., Марченко Т. В., Половникова И. Н. Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 3, с. 655-665.
10. Monastyrskaya G. S., Губанов В. В., Гурьев С. О., Липкин В. М., Сverdlov E. D. Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 7, с. 1106-1109.
11. Szalay A. A., Grohmann K., Sinsheimer R. L. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 5, p. 1569-1578.

Поступила в редакцию
24.III.1982

LOCALIZATION OF CYTIDINE AND URIDINE UNITS IN DNA

SVERDLOV E. D., PAK V. N., MONASTYRSKAYA G. S.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

A method for localization of the cytidine units in DNA or uridine units in the uracil-containing DNA is proposed. It is based on a specific removal of DNA uracil residues by treatment with N-uracilglycosidase. Terminally labeled uracil-containing DNA fragments are treated with N-uracilglycosidase and subsequently cleaved with piperidine at the nascent deoxyribose units. The lengths of the DNA fragments [³²P]-labeled at their termini were compared with those resulting from the other specific cleavages of the DNA by the Maxam - Gilbert method. The proposed method can be used for localization of cytidine units in DNA after their deamination.