



УДК 577.113.5

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК С ПЕРЕКИСЬЮ ВОДОРОДА.
МЕТОД ЛОКАЛИЗАЦИИ ПИРИМИДИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ В ДНК*Свердлов Е. Д., Калинина Н. Ф.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

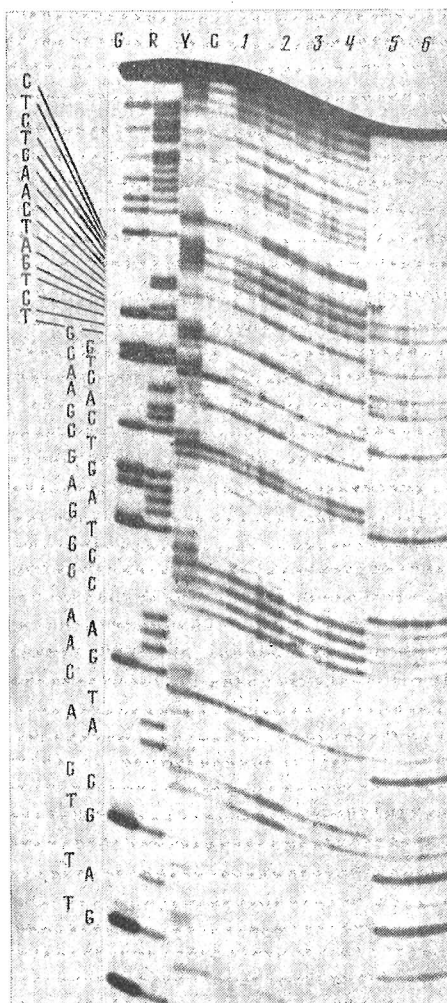
В настоящее время для установления первичной структуры ДНК широко применяется метод Максама — Гилберта, основанный на химической модификации гетероциклических оснований [1]. Используемая в этом методе реакция с гидразином для определения пиримидиновых звеньев довольно часто не дает надежных результатов.

В нашем сообщении описано взаимодействие ДНК с перекисью водорода, модифицирующей цитидиновые и тимидиновые звенья в зависимости от различных значений рН среды. Эта модификация может быть использована для локализации пиримидиновых нуклеотидов. Известно, что H_2O_2 взаимодействует с пиримидиновыми основаниями как в моно-, так и в полинуклеотидах [2—4]. Нами показано, что модифицированная перекисью ДНК может быть расщеплена по прореагировавшим звеньям обработкой пиперидином в условиях, применяющихся в методе Максама — Гилберта [1]. Скорость модификации одноцепочечной ДНК намного выше скорости модификации двухспиральных молекул. И скорость модификации, и ее специфичность зависят от рН. При рН 7—8,5 ДНК после обработки пиперидином расщепляется практически только по цитидиновым звеньям. При значениях рН > 9 расщепление затрагивает в основном остатки тимидина. При промежуточных значениях рН затрагиваются и те и другие звенья. Следовательно, модификация может использоваться для локализации остатков С и Т при определении первичной структуры ДНК.

В типичном эксперименте по определению положений С- и Т-звеньев 10 пмоль двухцепочечного фрагмента метили с помощью $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ и полинуклеотидкиназы бактериофага Т4 [5], цепи разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле [6], элюировали и осаждали этиловым спиртом [1]. Осажденные индивидуальные цепи растворяли в 30—35 мкл 0,1 М буфера (трис-НСl, рН 8,0; карбонатный буфер, рН 9,3 и 10,8). При добавлении H_2O_2 рН меняется до значений 7,4; 8,3 и 9,6 соответственно. К полученному раствору добавляли EDTA до концентрации 1 мМ и 10—15 мкл 30% водного раствора H_2O_2 (BDH, Англия). Конечные концентрации H_2O_2 в реакционной смеси составляли 2 и 3 М. Смесь инкубировали 1 ч при 37° С, после чего ДНК осаждали спиртом, растворяли в 100 мкл 10% раствора пиперидина, нагревали 30 мин при 90° С, затем охлаждали и подвергали лиофильной сушке. После растворения в 70% формамиде, содержащем маркерные красители, смесь ^{32}P -меченых олигонуклеотидов разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле. В параллельных дорожках разделяли ^{32}P -меченые продукты, полученные в результате расщепления этой же цепи путем стандартных реакций, используемых в методе Максама — Гилберта.

Результаты типичного эксперимента приведены на рисунке. Легко видеть, что реакция с H_2O_2 определяет положения С- и Т-звеньев.

В случае модификации двухцепочечных фрагментов оказалось, что реагент чувствителен к особенностям вторичной структуры. Вследствие этого в сильнощелочной среде наблюдались различия в степени модифи-



Модификация ДНК перекисью водорода для определения положения С- и Т-звеньев. Условия модификации см. в тексте. Электрофорез в 10% полиакриламидном геле. Колонки 1-6 представляют продукты расщепления после модификации 2 М H_2O_2 (1, 3, 5) и 3 М H_2O_2 (2, 4, 6) при pH 7,4 (1, 2), 8,3 (3, 4) и 9,6 (5, 6). Для сравнения приведен анализ продуктов расщепления после модификации диметилсульфатом [1] (G), после апуринизации HCOOH [7] (R), после модификации гидразином [1] (Y) и гидразином в присутствии 4 М NaCl [1] (C)

кации нуклеотидных остатков в зависимости от их положения в полинуклеотидной цепи.

Равномерная и строго специфичная модификация одноцепочечных фрагментов ДНК при реакции с перекисью водорода, простота этой реакции дают возможность использовать эту модификацию в качестве одной из стандартных реакций для определения первичной структуры ДНК и для исследования особенностей вторичной структуры ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Maxam A., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560-564.
2. Rhaese H. J., Freese E., Melser M. S. Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 155, № 2, p. 491-504.
3. Gemant A. Mol. Biol. Rep., 1981, v. 8, № 1, p. 21-24.
4. Priess H., Zillig W. Z. Physiol. Chem., 1965, B. 342, № 1-3, S. 73-80.

5. Panet A., Van de Sande J.-H., Loewen P. C., Khorana H. G., Raae A. J., Zillehaug J. R., Kleppe K. *Biochemistry*, 1973, v. 12, № 25, p. 5045-5049.
6. Szalay A. A., Grohmann K., Sinsheimer R. L. *Nucl. Acids Res.*, 1977, v. 4, № 5, p. 1569-1578.
7. Ovchinnikov Yu. A., Guryev S. O., Krayev A. S., Monastyrskaya G. S., Skryabin K. G., Sverdlov E. D., Zakharyev V. M., Bayev A. A. *Gene*, 1979, v. 6, № 3, p. 235-249.

Поступило в редакцию
14.VII.1983

DNA INTERACTION WITH HYDROGEN PEROXIDE. A METHOD FOR DETERMINING PYRIMIDINE BASES IN DNA

SVERDLOV E. D., KALININA N. F.

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

Incomplete modification with hydrogen peroxide of the DNA fragments labeled at one terminus is shown to be useful for localisation of C and T residues along the polynucleotide chain. The fragments can be split at modified residues with piperidine after hydrogen peroxide treatment. The rate of the reaction of the single-stranded fragments is extremely fast, much higher than that of the double-stranded DNA. Splitting of the DNA takes place at C if pH 7,4, and at T at pH 9,6. The modification can be used to investigate the DNA structure and function.