



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.113.4/5

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК С N-БРОМСУКЦИНИМИДОМ.
G+C-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ, ПОТЕНЦИАЛЬНО ПОЛЕЗНАЯ
ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

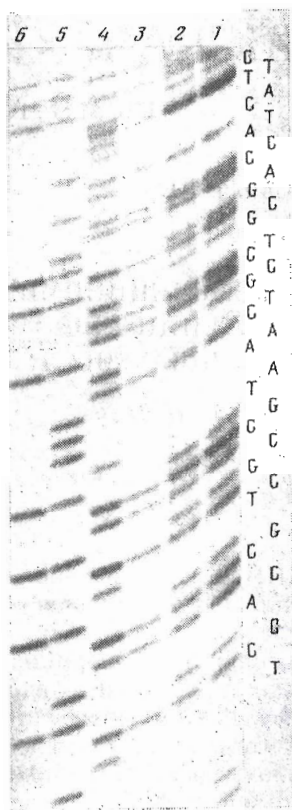
Свердлов Е. Д., Калинин Н. Ф.

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

Методы химической модификации ДНК широко и успешно используются в настоящее время для установления их первичной структуры [1]. Значительно хуже обстоит дело при исследовании функций регуляторных участков ДНК, таких, как промоторы, операторы, терминаторы и т. д. В этом случае до сих пор применялся почти исключительно один метод модификации — метилирование диметилсульфатом, в результате которого реагируют N(7)-атом гуанозина и N(3)-атом аденозина в двуспиральных молекулах, а в одноцепочечных молекулах, кроме того, модифицируются N(1)-атом аденозина и N(3)-атом цитидина. Ясно, что для получения более детальной информации об основаниях, существенных для функциональной активности участков ДНК, необходимы модификации, затрагивающие другие группы гетероциклических ядер.

В данном сообщении описывается модификация ДНК N-бромсукцинимидом, затрагивающая C(8)-атом гуанозина и двойную связь C(5)=C(6) цитидина. При этом показано, что модифицированная ДНК может быть расщеплена по прореагировавшим звеньям обработкой пиперидином в условиях, применяющихся в методе Максама — Гилберта [1]. Следовательно, модификация может использоваться для локализации суммы G- и C-остатков при определении первичной структуры ДНК. Другой важной особенностью реакции с N-бромсукцинимидом является различие в скоростях модификаций одноцепочечных и двухцепочечных фрагментов, причем скорость модификации первых значительно более высока. Это открывает принципиальную возможность исследования особенностей вторичной структуры ДНК и, в частности, локализации более легколабильных участков. Для локализации гуанозиновых и цитидиновых звеньев ДНК была использована та же принципиальная схема, что и в методе Максама — Гилберта.

Фрагмент, меченный ^{32}P по концевому звену, обрабатывается N-бромсукцинимидом в условиях, обеспечивающих модификацию в среднем только одного нуклеотидного звена на фрагмент, и после этого расщепляется по прореагировавшим звеньям пиперидином. Длины образующихся при расщеплении меченых концевых фрагментов указывают на положение модифицированных звеньев и определяются путем электрофореза в полиакриламидном геле в сопоставлении с длинами фрагментов, получаемых при расщеплении по другим типам звеньев. Реакция с N-бромсукцинимидом протекает с очень высокой скоростью и, хотя абсолютная концентрация реагента, необходимая для модификации, невелика (0,4–8 мМ), она существенно выше обычной концентрации модифицируемого меченого фрагмента (0,01 мкМ). Для того чтобы обеспечить необходимую малую степень модификации, в реакционную смесь добавляется еще один компонент — ловушка (Л), — способный реагировать с N-бромсукцинимидом. При избыточной концентрации этого компонента N-бромсукцинимид расходуется практически полностью, и в конце реакции степень модификации



Использование модификации ДНК N-бромсукцинимидом для определения положения G- и C-звеньев. Условия модификации см. в тексте. Для разделения использован 10% полиакриламидный гель. Колонки 1 и 2 — продукты расщепления после модификации N-бромсукцинимидом. Колонка 6 — расщепление после модификации диметилсульфатом [1], 5 — расщепление после алуринизации муравьиной кислотой [4], 4 — расщепление после модификации гидразином, 3 — расщепление после модификации гидразином в присутствии 4 M NaCl [1]

оснований в ДНК может быть приближенно определена соотношением

$$\frac{G^* + C^*}{G + C} = \frac{k_2}{k_1} \cdot \frac{[Л^*]}{[Л]}$$

где G^* и C^* — среднее количество модифицированных звеньев во фрагменте, G и C — общее количество звеньев во фрагменте, $[Л^*]$ — концентрация модифицированного компонента-ловушки, $[Л]$ — его общая концентрация, k_2 и k_1 — константы скорости реакции N-бромсукцинимида с $G+C$ и с $Л$ соответственно. Ясно, что, меняя концентрацию компонента-ловушки, можно менять степень модификации, доводя при этом реакцию до конца.

Таким образом, вместо того чтобы регулировать степень модификации, меняя время реакции, предлагается другой метод — метод конкурентной модификации, в котором степень модификации определяется концентрацией компонента-ловушки. Этот прием может использоваться во всех случаях при использовании быстрых реакций. В типичном эксперименте по определению положений G+C-звеньев 10 пмоль двухцепочечного фрагмента метили ^{32}P с помощью $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ и полинуклеотидкиназы бактериофага T4 [2], цепи разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле [3], элюировали и осаждали этиловым спиртом [1]. Осажденные индивидуальные одноцепочечные фрагменты растворяли в 100 мкл 3 мМ трис-HCl-буфера (pH 7,4). К полученному раствору добавляли 8 мкл 2,5 М аллилового спирта (компонент-ловушка) и 8 мкл водного раствора N-бромсукцинимида с концентрацией 5 мМ. Конечные концентрации аллилового спирта и N-бромсукцинимида в реакционной смеси составляли 100 и 0,4 мМ соответственно. Смесь инкубировали 5 мин при 20° C, после чего ДНК осаждали спиртом, растворяли в 100 мкл 10% раствора пиперидина, нагревали 30 мин при 90° C, затем охлаждали и подвергали лиофильной сушке. После растворения в 70% формамиде, содержащем маркерные красители, смесь олигонуклеотидов разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле. В параллельных дорожках разделяли ^{32}P -меченые продукты, полученные в результате расщепления того же фрагмента ДНК путем стандартных реакций, используемых в методе Максама — Гилберта.

Результаты типичного эксперимента приведены на рисунке. Легко видеть, что реакция с N-бромсукцинимидом определяет положения G- и C-звеньев. Специфичность сохраняется и в случае двухцепочечных фрагментов (результаты не приведены). Однако в этом случае скорость модификации ДНК существенно ниже и необходимо использовать более низкие концентрации компонента-ловушки. Кроме того, при модификации двухцепочечных фрагментов наблюдается неравномерное распределение модифицированных звеньев вдоль цепи, что связано, очевидно, с одной стороны, с различиями в способности к локальной денатурации, а с другой — с природой соседних оснований. Эта проблема будет обсуждена отдельно. Равномерная и строго специфичная модификация одноцепочечных фрагментов ДНК при реакции с N-бромсукцинимидом, простота этой модификации и то обстоятельство, что в большинстве случаев выгодно определять первичную структуру фрагментов после разделения их комплементарных цепей, дают возможность использовать эту модификацию в качестве одной из стандартных реакций для определения первичной структуры ДНК. Результаты ее использования для исследования процессов комплексообразования РНК-полимеразы *E. coli* с промоторами будут опубликованы отдельно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Maxam A., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560—564.
2. Panet A., Van de Sande J. H., Loewen P. C., Khorana H. G., Raae A. J., Lillchaug J. R., Kleppe K. Biochemistry, 1973, v. 12, № 25, p. 5045—5049.
3. Szalay A. A., Grohmann K., Sinsheimer R. L. Nucleic Acids Res., 1977, v. 4, № 5, p. 1569—1578.
4. 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
1.XII.1982

DNA INTERACTION WITH N-BROMOSUCCINIMIDE. G+C SPECIFIC REACTION POTENTIALLY USEFUL FOR STRUCTURAL AND FUNCTIONAL INVESTIGATIONS

SVERDLOV E. D., KALININA N. F.

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

Incomplete modification of DNA fragments labeled at one terminus with N-bromosuccinimide is shown to be useful for localisation of G and C residues along the polynucleotide chain. After N-bromosuccinimide treatment the fragments can be split at modified residues with piperidine. The rate of the reaction of the single-stranded fragments is extremely fast and much higher than that of double-stranded DNA. The modification can be used for structure and function studies on DNA.