



УДК 577.113.4.012

ЛОКАЛИЗАЦИЯ РАСПЛАВЛЕННЫХ УЧАСТКОВ
В СВЕРХСПИРАЛЬНОЙ ДНК ПРИ ПОМОЩИ ХИМИЧЕСКОЙ
МОДИФИКАЦИИ

Волошин О. Н., Любченко Ю. Л.* , Шляхтенко Л. С.*

Научно-производственное объединение «Биотехнология»,
Министерство медицинской и микробиологической промышленности;
* Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва

Химическая модификация оснований нуклеиновых кислот представляет собой наиболее прямой путь зондирования структурных особенностей ДНК в растворе. Используя химическую модификацию, удалось значительно продвинуться в понимании процессов образования в сверхспиральных ДНК (ссДНК) участков со структурой, отличающейся от обычной В-формы: левоспиральная Z-форма [1, 2], крестообразные [3, 4] и протонированные [5] структуры. В то же время наши знания об образовании в ссДНК участков с разрушенной спиральной структурой очень ограничены, хотя вопрос об образовании таких структур в ссДНК крайне важен для понимания механизмов основных генетических процессов. Недавно для изучения процесса ранней денатурации ссДНК нами был применен метод гель-электрофореза в градиенте концентрации денатурирующих агентов [6]. В результате удалось не только наблюдать процесс образования денатурированных участков в отдельных топоизомерах, но и получить некоторые его количественные характеристики. Однако оставался открытым крайне важный вопрос о локализации в молекуле ДНК плазмиды рАОЗ участков ранней денатурации. Решение этой задачи и было целью настоящей работы.

В работе был применен подход, основанный на модификации ДНК диэтилпирокарбонатом, карбоксилирующим пуриновые основания в составе ДНК (преимущественно остатки аденина). Поскольку при действии $O(CO_2Et)_2$ двунитевая ДНК в В-форме модифицируется значительно слабее, чем однонитевая [7], именно этот реагент использован для модификации расплавленных участков в ссДНК.

ДНК плазмиды рАОЗ модифицировали действием диэтилпирокарбоната в условиях, при которых в работе [6] наблюдалось плавление наиболее скрученных топоизомеров, и после расщепления ДНК в местах модификации проводили анализ данных на нуклеотидном уровне.

Препарат ДНК рАОЗ обрабатывали химическим агентом в следующих условиях: 40 мМ трис-ацетат, 20 мМ Na-ацетат, 2 мМ EDTA, pH 7,8, в присутствии денатурирующих агентов — формамида с мочевиной. За 100% концентрации денатурантов принимали смесь, содержащую 40% формамида и 7 М мочевины. Модификацию проводили при 33° С, время модификации 5 мин, кроме особо оговоренных случаев. Реакцию останавливали добавлением 2-меркаптоэтанола с последующей гель-фильтрацией на сефадексе G-50 для удаления мочевины и формамида. После расщепления рестриктазой *EcoRI* модифицированную ДНК метили по 3'-концам с помощью ДНК-полимеразы А или по 5'-концам с помощью T4-полинуклеотидкиназы; после обработки *HpaII* с последующим электрофорезом в ПААГ выделяли меченый субфрагмент размером 805 п.о. Фрагмент обрабатывали 15 мин 10% раствором пиперидина при 90° С и продукты химической деградации разделяли в 10% денатурирующем ПААГ.

На рис. 1 приведены данные по анализу наиболее AT-богатой области ссДНК плазмиды рАОЗ, включающей главный палиндром [3, 4, 6, 7].

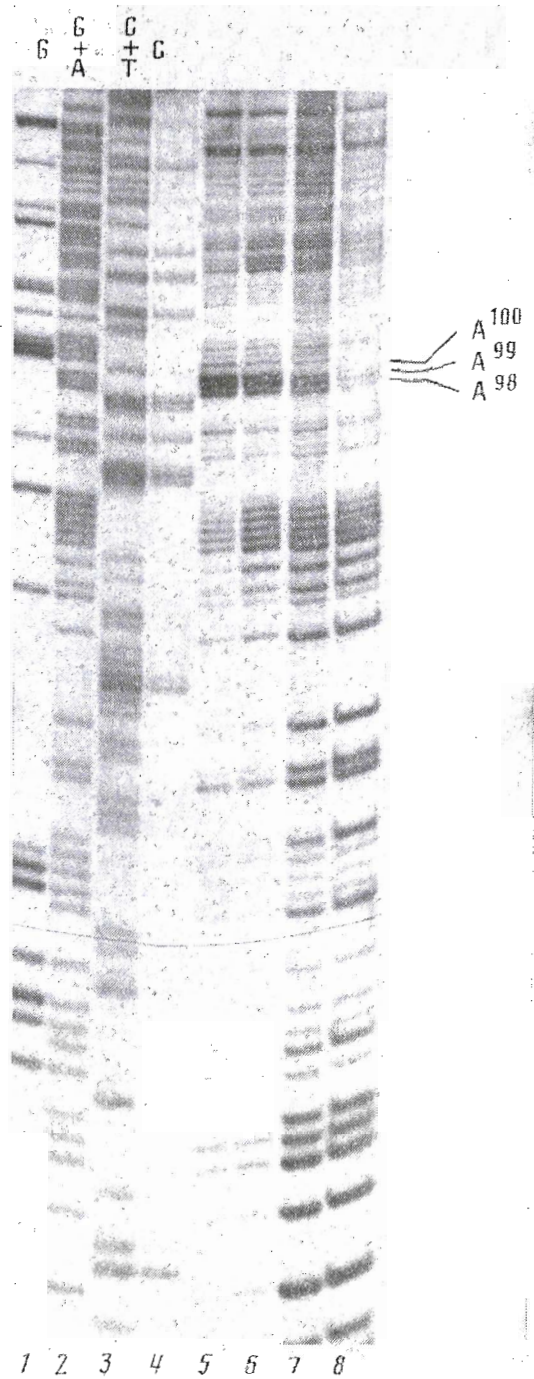


Рис. 1. Радиоавтограф электрофореграммы *EcoRI-HpaII*-фрагмента ДНК плазмиды рАОЗ, меченного по 5'-концу *EcoRI*-сайта, обработанного по методу Максама - Гилберта с модификациями [8] (дорожки 1-4) или диэтилпирокрбонатом при 33° С: дорожка 5 - в отсутствие денатурирующих агентов, 6 - в присутствии 20%, 7 - 40%, 8 - 60% денатурантов

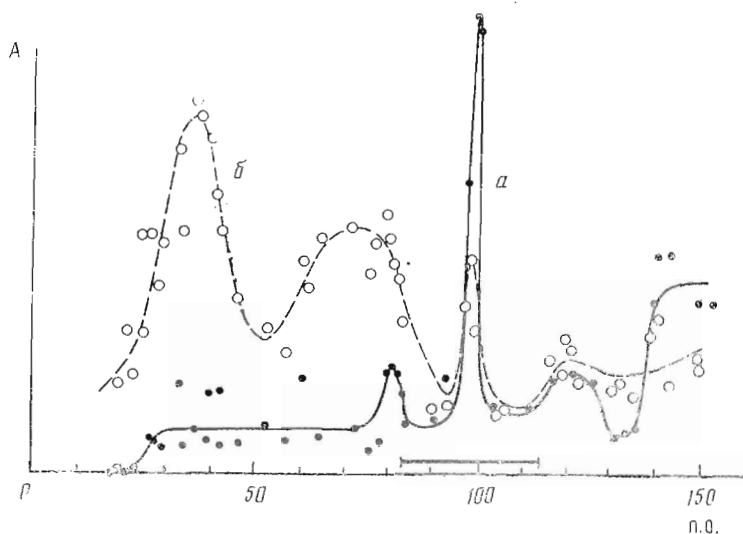


Рис. 2. Результаты денситометрирования дорожек радиоавтографов гелей, соответствующих модификации диэтилпрокарбонатом нативной ДНК рАОЗ (а) и в присутствии 40% денатурантов (б), условия — в тексте. Каждая точка или кружок отвечает максимальной амплитуде пика на денситограмме дорожек 5 и 7 на рис. 1. Жирной чертой внизу отмечена главная палиндромная последовательность ДНК плазмиды рАОЗ, образующая крестообразную структуру

Видно, что в нативной ДНК наиболее интенсивно модифицируются остатки A^{98} , A^{99} , A^{100} , расположенные в петле крестообразной структуры, что согласуется с данными работ [3, 4]. Денатурация ДНК приводит к тому, что заметно увеличивается степень модификации оснований в других местах, но одновременно сильно снижается степень модификации оснований в вершине креста. Различия в модификации диэтилпрокарбонатом нативной и начавшей плавиться ссДНК плазмиды рАОЗ показано на рис. 2, где приведены данные фотометрирования дорожек 5 и 7 (рис. 1) радиоавтографа геля. Видно, что в ДНК плазмиды рАОЗ на поздних стадиях плавления (40% денатурантов) очень сильно модифицируются два участка длиной примерно по 30 п.о., расположенные слева от главного палиндрома (кривая б рис. 2). Более подробный анализ данных, полученных при различных степенях денатурации, выявил следующие особенности равного плавления ссДНК рАОЗ: на начальных этапах по краям креста образуются два расплавленных участка длиной 10–15 п.о., затем происходит образование более протяженных денатурированных участков слева от палиндрома, одновременно исчезает крестообразная структура и расплавленный участок справа от нее. Таким образом, химическая модификация дает возможность не только зондировать в ДНК участки с необычной структурой, но и проследить динамику перестроек в структуре ссДНК по мере ее плавления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Johnston B. H., Rich A. // *Cell*. 1985. V. 42. № 3. P. 713–724.
2. Herr W. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1985. V. 82. № 23. P. 8009–8813.
3. Scholten P. M., Nordheim A. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. № 10. P. 3981–3993.
4. Furlong J. C., Lilley D. M. J. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. № 10. P. 3995–4007.
5. Voloshin O. N., Mirkin S. M., Lyamichev V. I., Belotserkovskii B. P., Frank Kamenetskii M. D. // *Nature*. 1988. V. 333. № 6172. P. 475–476.
6. Lyubchenko Yu. L., Shlyakhtenko L. S. // *Nucl. Acids Res.* 1988. V. 16. № 8. P. 3269–3288.

7. Herr W., Gilbert W. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. № 21. P. 6931-6944.

8. Ovchinnikov Yu. A., Curvey S. O., Kraev 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
7.VI.1988

LOCALIZATION OF MELTED REGIONS IN SUPERCOILED DNA BY MEANS OF CHEMICAL MODIFICATION

VOLOSHIN O. N., LYUBCHENKO Yu. L.*, SHLYAKHTENKO L. S.*

*Institute of Biotechnology, Minmedmicrobioprom: * Institute of Molecular Genetics,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Diethyl pyrocarbonate was used as a probe in mapping early melting stages in supercoiled DNA. It was shown that in the process of early melting of pAO3 DNA two denatured regions (about 15 b.p.) arose near the left and right boundaries of the cruciform structure. In course of further melting denatured regions appeared within AT-rich stretches and the cruciform structure itself disappeared.