



УДК 547.963.32.02

ОБ АНАЛОГЕ ЦИТОЗИНА В ДНК БАКТЕРИОФАГА
SHIGELLA SONNEI «УФА»Александровичкина Н. И., Кириос М. Д., Маградзе Н. М.,
Замчук Л. А., Гольдфарб Д. М., Ванюшин В. Ф.Лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова;

Институт генетики Академии наук СССР, Москва

ДНК бактериофага *Shigella sonnei* «Уфа» вместо цитозина содержит необычный структурный аналог, который выделен в виде дезоксирибонуклеозида и дезоксирибонуклеозид-3'-5'-дифосфата, с максимумами поглощения в 0,1 н. HCl в области 295 нм (ϵ нуклеотида 12 800), а в 0,1 н. КОН — 286 нм.

Бактериофаг *Shigella sonnei* «Уфа» по морфологии частиц негативных колоний близок к группе Т-четных фагов *E. coli* [1]. Выделенная из него нуклеиновая кислота обладает высокой иммуногенной активностью, свидетельствующей о присутствии в ней необычного основания [2, 3]. Это основание не является ни 5-оксиметилцитозином, ни гликозилированным 5-оксиметилцитозином, ни 5-оксиметилурацилом [2—4]. Нуклеиновая кислота фага представлена ДНК: дает типичную реакцию на дезоксирибозу с дифениламином по Дише, не гидролизуется щелочью (0,7 М NaOH, 37°, 18 ч) и панкреатической РНКазой в стандартных условиях. Коэффициент седиментации фаговой ДНК равен 53 S, что соответствует молекулярному весу $1,11 \cdot 10^8$ [5—7]. Профиль плавления этой ДНК характерен для двуспиральной структуры. Температура плавления (T_m) в стандартном солевом растворе равна 86,5°. Она плавится в узком интервале температур (ΔT_m 4°), что характерно для гомогенных вирусных ДНК.

В стандартном солевом растворе λ_{\max} и λ_{\min} поглощения как нативной, так и денатурированной нагреванием ДНК (рис. 1) равны соответственно 257 и 230 нм. Спектральное отношение D_{260}/D_{280} составило 1,75 для нативной и 1,67 для денатурированной форм. Вместе с необычным спектром КД (рис. 2) (отрицательная величина первого максимума) и иммунными свойствами этой ДНК низкие спектральные отношения при 260 и 280 нм могли указывать на присутствие каких-то необычных оснований в этой ДНК.

Используя стандартный кислотный гидролиз ДНК [8] и последующую ТСХ оснований на целлюлозе в системе А (см. «Экспериментальную часть»), удалось разделить три обычных для ДНК основания: аденин, тимин и гуанин и четвертое, по хроматографической подвижности (R_f 0,45) близкое к цитозину (R_f 0,48), обладающее голубой флуоресценцией в УФ-свете ($\lambda_{\text{возб}}$ 308 нм, $\lambda_{\text{макс}}$ флуор 378 нм). При ТСХ оснований на катионообменнике Fixion 50 \times 8 в системе Г это вещество по подвижности оказалось

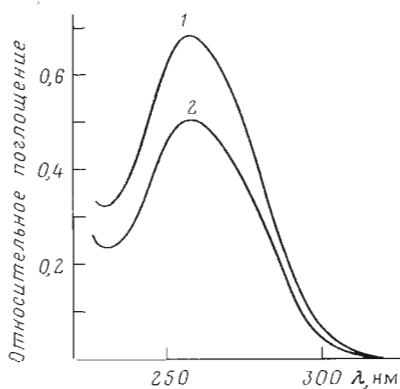


Рис. 1

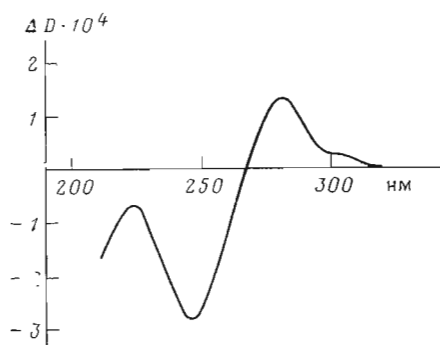


Рис. 2

Рис. 1. Спектры поглощения денатурированной (1) и нативной (2) ДНК из фага «Уфа» в стандартном солевом растворе

Рис. 2. Спектр кругового дихроизма ДНК фага «Уфа» в стандартном солевом растворе (0,195 OE_{260} в 1 мл)

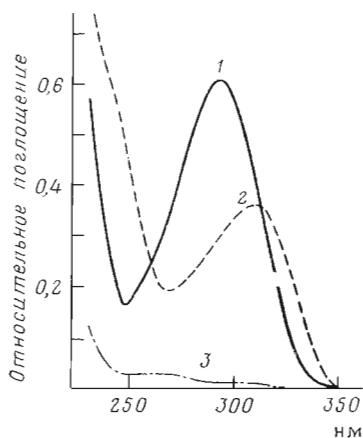


Рис. 3

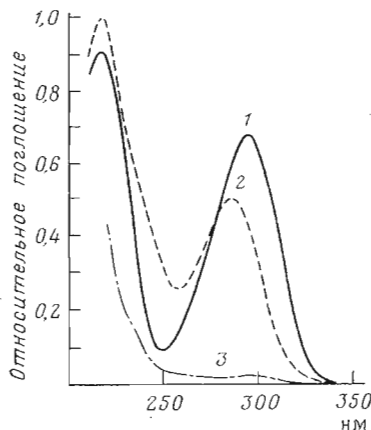


Рис. 4

Рис. 3. Спектр поглощения необычного нуклеинового основания, выделенного из ДНК фага «Уфа» путем гидролиза 57% $HClO_4$ (100°, 1 ч): 1 — в 0,1 н. HCl ; 2 — в 0,1 н. KOH ; 3 — после бромирования в 0,1 н. HCl

Рис. 4. Спектр поглощения необычного дезоксирибонуклеозида из ДНК фага «Уфа»: 1 — в 0,1 н. HCl ; 2 — в 0,1 н. KOH ; 3 — после бромирования в 0,1 н. HCl

сходным с цитозином и оксиметилцитозином (R_f 0,47). Однако по спектрам поглощения в 0,1 н. HCl (λ_{\max} 294 нм) и 0,1 н. KOH (λ_{\max} 310 нм) (рис. 3, табл. 1) оно резко отличалось от этих оснований, напоминая 5-оксипроизводные цитозина (урацила). При испарении растворов или хроматографии в кислых и щелочных системах растворителей это соединение нестабильно. Полное его разрушение (исчезновение УФ-поглощения) происходит в парах аммиака за несколько часов.

Такая лабильность могла быть следствием серьезных нарушений в структуре основания при жестком кислотном гидролизе. Поэтому мы выделили из ДНК фага «Уфа» соответствующий дезоксирибонуклеозид путем мягкого ферментативного гидролиза и ТСХ сначала на DEAE-целлюлозе в воде (R_f 0,9), а затем на целлюлозе в нейтральных системах E (R_f 0,03) и Ж (R_f 0,60). Спектральные характеристики необычного дезоксирибонуклеозида приведены в табл. 1 и рис. 4. По спектральным свойствам

Таблица 1
Спектральные свойства необычных «основания», дезоксирибонуклеозид и дезоксирибонуклеозид-3',5'-дифосфата из ДНК фага «Уфа»

Среда	Соединение	$\lambda_{\text{макс}}(1)$, нм	$\lambda_{\text{макс}}(2)$, нм	$\lambda_{\text{мин}}$, нм	$D_{\text{макс}}(1)/D_{\text{мин}}$	$D_{\text{макс}}(2)/D_{\text{мин}}$	D_{λ}/D_{280} для длин волн										
							230	240	250	270	280	290	300	310	320	330	340
0,1 н. НС1	Дезоксирибонуклеозид	246,5	295	250	10,0	7,5	3,85	1,43	0,57	1,93	3,24	4,35	4,36	3,02	1,41	0,24	0,03
	Дезоксирибонуклеозид-3',5'-дифосфат	—	295	248,5	—	6,15	2,74	1,10	0,60	1,69	2,54	3,37	3,38	2,42	0,94	0,20	0
	«Основание»	—	294,5	248,5	—	3,71	2,77	1,18	0,77	1,47	2,07	2,49	2,42	1,83	0,96	0,28	0,04
0,1 н. КО1	Дезоксирибонуклеозид	246,5	286	257,5	7,80	1,98	2,60	1,90	1,21	1,34	1,82	1,88	1,31	0,54	0,16	0,04	0,01
	Дезоксирибонуклеозид-3',5'-дифосфат	—	285	260	—	1,68	2,06	1,66	1,24	1,28	1,66	1,57	0,98	0,30	0,42	0	0
	«Основание»	—	310	268,6	—	1,88	3,27	2,42	1,77	0,74	0,86	1,07	1,26	1,38	1,23	0,79	0,27

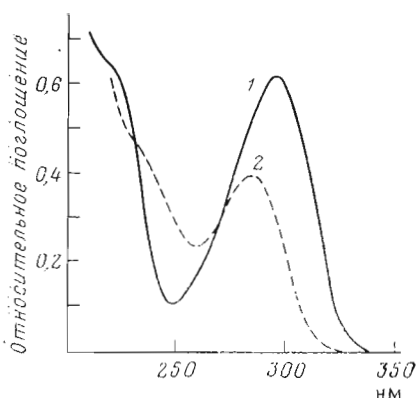


Рис. 5. Спектр поглощения необычного дезоксирибонуклеозид-3'-5'-дифосфата из ДНК фага «Уфа»: 1 — в 0,1 н. HCl; 2 — в 0,1 н. KOH

мах мы сравнили их спектральные и хроматографические свойства. Они оказались идентичными. Таким образом, в присутствии концентрированной HCl, а тем более при жестком кислотном гидролизе нуклеозид (основание) разрушается и (или) модифицируется, причем модификация затрагивает пятое (возможно, шестое) положение пиримидинового кольца.

При использовании как жесткого кислотного, так и мягкого ферментативного гидролиза ДНК фага «Уфа» мы не обнаружили ни цитозина, ни дезоксицитидина: они полностью замещены в этой ДНК соответствующим необычным аналогом.

Из ДНК фага «Уфа» мы выделили также необычный дезоксирибонуклеозид-3',5'-дифосфат. В описанных условиях деградации или модификации идентифицируемого компонента не происходит. По спектральным свойствам он близок дезоксирибонуклеозиду (табл. 1, рис. 5). Используя разработанный нами метод, мы определили коэффициент молярной экстинкции при $\lambda_{\text{макс}}$ 295 нм необычного нуклеотида (ϵ 12 800) и его изобестическую точку с тимидиловой кислотой (277 нм) в 0,1 н. HCl. Это позволило рассчитать содержание отдельных пиримидиновых последовательностей в ДНК фага «Уфа» (табл. 2). По относительно низкой сбалансированности пиримидиновых нуклеотидов и наличию необычного аналога цитозина, полностью замещающего это основание в ДНК, фаг «Уфа» резко отличается от Т-четных и Т-нечетных бактериофагов [10—13].

Таблица 2
Содержание нуклеотидного материала в пиримидиновых изоплитах из ДНК фага «Уфа»

Номер изоплита	Состав изоплита	Содержание пиримидиновых нуклеотидов, \bar{N} *	Номер изоплита	Состав изоплита	Содержание пиримидиновых нуклеотидов, \bar{N} *
I	Np_2^{**}	3,33±0,07	IV	N_1p_5	0,24±0,04
	Tp_2	10,67±0,10		$(N_3T_1)p_5$	0,40±0,08
II	N_2p_3	0,86±0,10	V	$(N_2T_2)p_5$	1,77±0,22
	$(NT)p_3$	4,38±0,11		$(NT_3)p_5$	2,24±0,31
III	T_2p_3	6,56±0,16	VI	T_1p_5	1,65±0,20
	N_3p_4	0,70±0,10		VII	(суммарный)
	$(N_2T)p_4$	3,83±0,23			2,30±0,30
	$(NT_2)p_4$	2,90±0,30		1,20±0,0	
	T_3p_4	2,87±0,07			

* \bar{N} — среднее арифметическое.

** N — необычный дезоксирибонуклеозид.

в воде, кислоте и щелочи нуклеозид из ДНК бактериофага «Уфа» не похож ни на одно известное производное цитозина, входящее в состав природных нуклеиновых кислот. При многократном рехроматографировании в нейтральных системах растворителей это соединение стабильно. Однако при ТСХ в системе изопропанол — 11 н. HCl — H₂O в течение 10—15 ч оно на 90% превращается в дезоксирибонуклеозид 5-оксицитозина, который мы синтезировали по методу [9] и очистили ТСХ в системах Д, Е и Ж. После рехроматографии полученного таким образом 5-оксидезоксицитидина с продуктом превращения необычного дезоксирибонуклеозида в вышеуказанных системах

Таким образом, в ДНК фага «Уфа» нет цитозина, а вместо него содержится необычное цитозиновое производное, у которого, по-видимому, имеются замещающие группы в 5-м положении (или 6-м) пиримидинового кольца.

Экспериментальная часть

Фаг *Shigella sonnei* «Уфа» получен из НИИ вакцины и сывороток Минздрава СССР (Тбилиси). Фаг выращивали на культуре *E. coli* CR 63. Культивирование бактерий и получение фаголизатов описано ранее [2, 4]. Фаг концентрировали осаждением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40% насыщения) и очищали дробным центрифугированием. Нуклеиновую кислоту из фага выделяли фенольным методом [14]. Коэффициент седиментации ДНК фага «Уфа» определяли в ультрацентрифуге Spinco E при 36 000 об/мин и 20° [5—7]. Плавление ДНК бактериофага проводили в стандартном солевом растворе (0,15 М NaCl, 0,015 М цитрат натрия, pH 7,0) на регистрирующем спектрофотометре Unicam SP-700 (Англия). УФ-спектры поглощения ДНК и ее компонентов получены на регистрирующем спектрофотометре Cary-15 (Varian, США). КД-спектр фаговой ДНК получен на приборе Roussel-Jouan Dichrograph II (Франция). Спектры флуоресценции компонентов фаговой ДНК получены на спектрофотофлуориметре Aminco-Bowman (США).

Определение состава ДНК фага «Уфа». ДНК гидролизовали до оснований 57% HClO_4 (100°, 1 ч) или 99% HCOOH (176°, 1 ч) [8]. Основания разделяли путем ТСХ на целлюлозе (Filtrak, ГДР) в системах растворителей: изопропанол — 11 н. HCl — H_2O , 170 : 45 : 35 (А), бутанол — H_2O — 25% NH_4OH , 60 : 10 : 0,1 (Б), изопропанол — H_2O , NH_3 в газовой фазе, 7 : 3 (В), или ТСХ на катионообменнике Fixion 50 × 8 (Chinoin, Венгрия) в 2,8 н. HCl [15] (Г).

Выделение необычного дезоксирибонуклеозида из фаговой ДНК. проводили путем ТСХ энзиматического гидролизата ДНК. Для этого ДНК последовательно гидролизовали панкреатической ДНКазой (Worthington, США; 150 мкг/мл, 0,01 М трис-HCl-буфер, pH 7,4—0,002 М MgCl_2 , 37°, 1 ч), добавляли новую порцию ДНКазы и инкубировали еще 1 ч. Затем pH гидролизата повышали до 8,5—9,0 и добавляли фосфодиэстеразу змеиного яда (200 мкг/мл) и 20 мкг/мл щелочной фосфатазы из *E. coli* (Worthington, США). Смесь инкубировали при 37° в течение 16 ч. Гидролизат депротенизировали встряхиванием с хлороформом. Дезоксирибонуклеозиды отделяли от нуклеотидного материала и разделяли ТСХ сначала на DEAE-целлюлозе (Reanal, Венгрия) в OH^- -форме в дистиллированной воде (система Д). УФ-поглощающий материал зоны с голубой флуоресценцией в УФ-свете (R_f 0,9) рехроматографировали в системе бутанол — H_2O , 60 : 10 (Е), в тонком слое целлюлозы Filtrak (ГДР), а затем в системе изопропанол — H_2O , 7 : 3 (Ж). Нуклеозид элюировали водой.

Выделение необычного дезоксирибонуклеозид-3',5'-дифосфата. ДНК бактериофага «Уфа» гидролизовали до пиримидиновых фрагментов по методу [16]. Пиримидиновые дезоксирибоолигонуклеотиды разделяли по длине и составу с помощью двумерной ТСХ на DEAE-целлюлозе [17]. Олигонуклеотиды из слоя элюировали 0,1 н. HCl.

Авторы выражают благодарность проф. Э. И. Будовскому за обсуждение результатов исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чанишвили Т. Г., Капанадзе Ж. С. (1967) Тр. Тбилисского НИИ ВС, 6, 49—64.
2. Zatchuk L., Magradze N., Goldfarb D. (1976) *Immunochemistry*, 13, 985—989.
3. Замчук Л. А., Маградзе Н. М., Гольдфарб Д. М. (1977) *Молекулярная биология*, 11, 323—331.
4. Замчук Л. А., Маградзе Н. М. (1976) *Вопр. вирусологии*, № 2, 161—166.

5. Шпикитер В. О. (1964) в кн. Современные методы в биохимии, под ред. В. Н. Ореховича, т. 1, с. 5—37, «Медицина», М.
6. Studier F. (1965) J. Mol. Biol., 2, 373—390.
7. Eigner J., Doty P. (1965) J. Mol. Biol., 12, 549—580.
8. Ванюшин Б. Ф. (1964) в кн. Современные методы в биохимии, под ред. В. Н. Ореховича, т. 1, с. 236—250, «Медицина», М.
9. Brammer K. W. (1963) Biochim. et biophys. acta, 72, 217—229.
10. Сурков В. В., Никольская И. И., Тихоненко Т. И. (1974) в сб. Структура и функции нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов, с. 33—34, МГУ.
11. Ванюшин Б. Ф., Боярских Г. В., Никольская И. И., Тихоненко Т. И. (1970) Докл. АН СССР, 195, 217—220.
12. Карагъзов Л. К., Лысенко А. М., Белоусова А. А. (1975) Биохимия, 40, 411—415.
13. Карагъзов Л. К., Лысенко А. М., Белоусова А. А. (1974) Биол. науки, № 3, 88—91.
14. Goldberg E. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 56, 1457—1463.
15. Tomasz J. (1975) Anal. Biochem., 68, 226—229.
16. Burton K., Petersen G. B. (1960) Biochem. J., 75, 17—27.
17. Kirnos M. D., Vasilyev V. K., Vanyushin B. F. (1975) J. Chromatogr., 104, 113—122.

Поступила в редакцию
13.III.1978

A CYTOSINE ANALOG IN *SHIGELLA SONNEI* «UFA» PHAGE DNA

ALEXANDRUSHKINA N. I., KIRNOS M. D., MAGRADZE N. M.,
ZAMCHUK L. A., GOLDFARB D. M., VANYUSHIN B. F.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic
Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow, and Institute
of General Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

An unusual cytosine analog was isolated from *Shigella sonnei* «Ufa» phage DNA in the form of nucleoside and nucleotide 3',5'-diphosphate. The position of its UV maximum in 0.1 N HCl is at 295 nm (ϵ 12 800) and in 0.1 N KOH at 286 nm.