



УДК 547.963.32.04

МОДИФИКАЦИЯ ДНК ДИБРОМЭТИЛАЦЕТАТОМ

II. ФИКСАЦИЯ ДЕНАТУРИРОВАННЫХ И РАСПЛЕТАНИЕ НАТИВНЫХ УЧАСТКОВ

*Личина М. В., Шугалий А. В., Тодоров И. Н.**Отделение Института химической физики Академии наук СССР,
Черноголовка, Московская область**Черный Д. И.**Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва*

Изучена модификация с помощью дибромэтилацетата частично денатурированной ДНК в интервале перехода спираль — клубок. Кривая степени модификации имеет двухступенчатый характер, соответствующий модификации доступных остатков цитозина и аденина в денатурированных областях и расплетанию нативных участков молекулы. Состав расплавленных областей на стадиях денатурации существенно отличается от среднего (G+C)-состава ДНК (при 5% денатурации содержание G+C ~ 20%). Продемонстрирована возможность использования дибромэтилацетата как агента, фиксирующего ДНК для задач электронно-микроскопического картирования. Расплетание нативных участков ДНК происходит, по-видимому, с концов молекулы, без инициаций новых центров, причем константа скорости этого процесса в 4–10 раз меньше константы скорости модификации остатков цитозина и аденина в расплавленных областях. Определена средняя длина спирального участка ДНК в середине интервала плавления.

В денатурированной ДНК модификация дибромэтилацетатом всех доступных остатков цитозина в расплавленных областях происходит за 12–15 мин, после чего количество этеноцитозина медленно растет и в течение последующих 1–1,5 ч модифицируются практически все остатки цитозина в составе ДНК. Взаимодействие остатков аденина с дибромэтилацетатом происходит аналогично, однако скорость модификации для доступных аденинов в 3 раза меньше, чем для соответствующих цитозинов [1].

Если учесть, что при модификации происходят необратимые изменения указанных оснований, то в соответствующих участках ДНК становится невозможным восстановление водородных связей между комплементарными основаниями. Это могло бы позволить использовать дибромэтилацетат, с одной стороны, для фиксации участков с нарушенной вторичной структурой, а с другой — для определения процентного вклада остатков аденина и цитозина в зафиксированных участках, поскольку аденин и этеноаденин (аналогично цитозин и этеноцитозин) различаются по целому ряду характеристик [2]. Более того, повышенная устойчивость этеновых производных указанных оснований в жестких условиях гидролиза позволяет рассчитывать на стабильность зафиксированной структуры при дальнейших манипуляциях, в частности в задачах электронно-микроскопического картирования участков с нарушенной вторичной структурой.

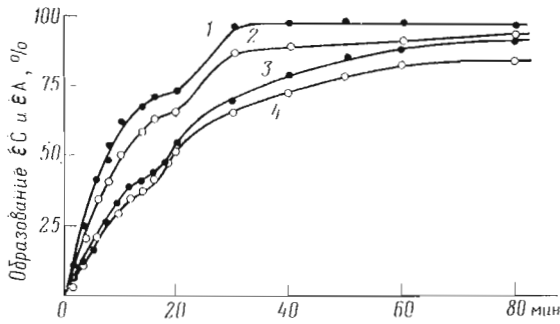


Рис. 1. Кинетика модификации остатков цитозина (1, 3) и аденина (2, 4) в составе частично денатурированной ДНК при 80° (1, 2) и 77,3° (3, 4). Исходное содержание аденина или цитозина принято за 100%

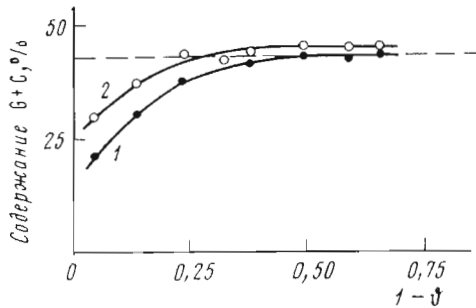


Рис. 2. Содержание G,C-пар в расплавленных участках ДНК в зависимости от степени денатурации $1 - \phi$. Кривые получены из данных по модификации аденина без учета (2) и с учетом (1) поправки на неполноту модификации за 15 мин; пунктиром показано содержание G·C-пар в тотальном препарате ДНК

Целью работы было изучение кинетики взаимодействия дибромэтилацетата с остатками аденина и цитозина на разных стадиях термической денатурации ДНК эритроцитов цыпленка, определение состава оснований в деспирализованных областях, а также демонстрация возможности использования этого реагента как для фиксации таких областей при их электронно-микроскопическом картировании, так и для расплетения нативных участков ДНК. Часть результатов в виде краткого сообщения была опубликована ранее [3].

Состав расплетенных областей ДНК. Сложный двухступенчатый характер кривой зависимости образования этеновых производных аденина и цитозина от времени модификации наблюдается при всех исследованных (5–65%) степенях денатурации ДНК (рис. 1).

Поскольку скорость модификации цитозина дибромэтилацетатом при 70–80° такова, что за 15 мин успевают прореагировать практически все (92–97%) доступные для модификации остатки цитозина в составе ДНК, то можно полагать, что перегиб кривой кинетики образования этеноцитозина в областях 12–15 мин соответствует содержанию цитозина в расплавленных при данной температуре участках ДНК.

Для аденина ситуация несколько осложняется тем, что скорость его модификации меньше, поэтому за 15–20 мин (время, соответствующее перегибу на кривой образования этеноаденозина (рис. 1)) успевает прореагировать только 60–70% всех доступных остатков аденина. Это обстоятельство вынуждает вводить при каждой температуре модификации соот-

ветствующую поправку, которая, исходя из достигнутого процентного содержания этеноаденина за время модификации 15 мин, позволила бы рассчитать количество всех доступных остатков аденина в расплавленных участках. Значения поправок вычисляли из зависимостей степени модификации денатурированных ДНК от времени при соответствующих температурах.

Определение процентного содержания аденина и цитозина в расплавленных участках было проведено при различных температурах в интервале плавления ДНК. Учитывая правило комплементарности, найденные значения использовали для определения относительной доли G,C-пар в расплавленных участках. Эти данные приведены на рис. 2 (кривая 1). Отметим, что при наименьшей степени денатурации ДНК (~5%), при которой мы еще наблюдали отчетливый уровень перегиба, расплавленные участки содержат всего 21% G,C-пар (по сравнению с 43% содержания G+C в тотальном препарате ДНК, что отмечено пунктиром на рис. 2). С возрастанием процента денатурации расплавленные участки включают все большее количество G,C-пар, и при ~50% денатурации ДНК они не отличаются по составу от тотальной ДНК.

Если не принимать во внимание уже упоминавшуюся поправку, учитывающую неполноту модификации за 15 мин остатков аденина в расплавленных областях, то рассчитанный по ϵA G+C-состав расплавленных областей оказывается несколько завышенным (рис. 2, кривая 2). Так или иначе, по истинные значения состава расплавленных областей не выходят за границы зоны, ограниченной кривыми 1 и 2 на рис. 2.

Хотя утверждение о высоком содержании (A+C)-пар в расплавленных участках на ранних стадиях денатурации достаточно очевидно (определение состава с помощью известных расчетных приемов [4] дает сходные результаты), наше определение состава тем не менее является прямым и на ДНК (по крайней мере животного происхождения) проведено впервые.

Фиксация расплавленных областей для электронной микроскопии. В области перегиба кривых образования этеноаденозина и этеноцитозина (рис. 1) стрессные модифицированных остатков цитозина и аденина изменено настолько, что восстановление в этих участках молекулы ДНК двуспиральной структуры невозможно. Это следует как из природы реакции [2], так и из того факта, что этеновые производные аденина и цитозина в опытах по реассоциации ДНК ведут себя как дефекты первичной структуры, препятствующие комплементарному взаимодействию [5].

Мы полагаем, что свойство дибромэтилацетата необратимо связываться с аденином и цитозином в составе денатурированных областей ДНК и препятствовать восстановлению в этих участках нативной структуры было бы целесообразно использовать для фиксации частично денатурированных молекул ДНК в задачах электронно-микроскопического картирования. Применяемый обычно для этих целей формальдегид не может по ряду причин считаться удобным реагентом. Основная причина — высокая скорость деспирализации ДНК формальдегидом при высоких температурах, что практически исключает его использование в качестве фиксирующего агента для ДНК в интервале температурного перехода спираль — клубок (за исключением, может быть, специально разработанных приемов [6]). Применение же формальдегида в качестве агента, дозированно «расплетающего» двойную спираль ДНК, вряд ли оправдано для определения состава расплетенных участков, поскольку связь между составом и скоростью расплетания неоднозначна [7].

Использование дибромэтилацетата в качестве фиксирующего агента продемонстрировано для температуры 78° при ~50% денатурации ДНК (рис. 3а). Поскольку в гетерогенном препарате животной ДНК вариация пуклеотидного состава фрагментов довольно велика и в интервале перехода присутствует смесь молекул в различных состояниях, мы выбрали

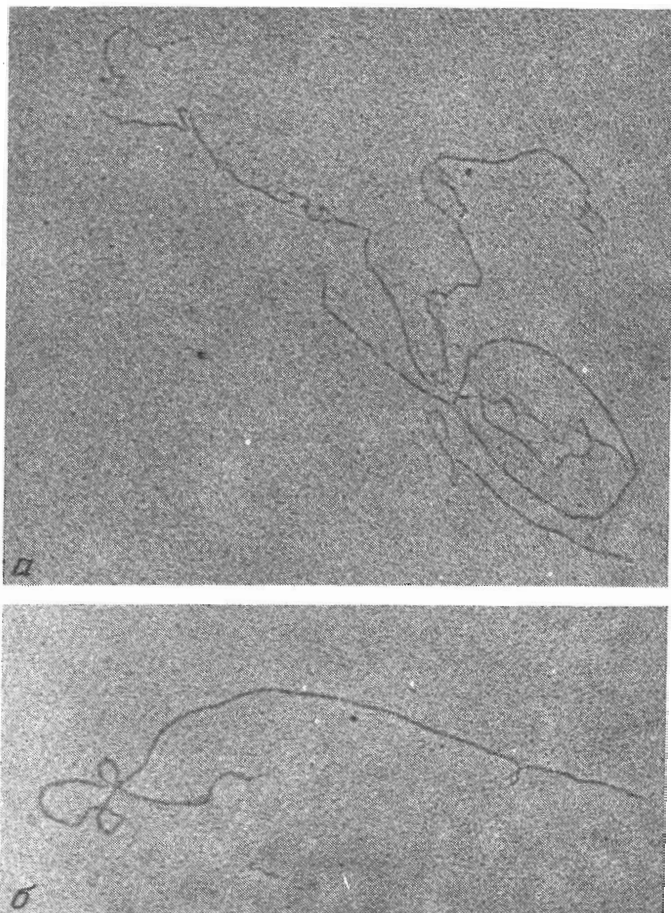


Рис. 3. Электронно-микроскопические фотографии ДНК после нагрева препарата до 78° ($\sim 50\%$ денатурации) с добавлением дибромэтилацетата (а) и без него (б)

для иллюстрации только некоторые частично денатурированные молекулы с отчетливой петлеобразной структурой. Здесь же (рис. 3б) для сравнения приведен снимок молекулы ДНК в препарате, прогретом до 78° , но без добавления дибромэтилацетата. Видно, что в отсутствие реагента молекулы ДНК в наших условиях практически полностью ренатурируют.

Относительная простота условий фиксации в совокупности с возможностью непосредственного определения состава зафиксированных участков делает дибромэтилацетат перспективным агентом для электронно-микроскопического картирования.

Кинетика взаимодействия дибромэтилацетата с нативными участками частично денатурированной ДНК. Все предыдущие измерения (модификация расплавленных участков, фиксация и т. д.) были проведены в условиях, когда денатурация ДНК проходила в водно-солевой среде, и дибромэтилацетат добавляли только после достижения соответствующих состояний ДНК (частичной или полной денатурации). Представляет интерес выяснить особенности процесса денатурации ДНК в буфере, содержащем модифицирующий агент. Кривая плавления представлена на рис. 4б. Поскольку регистрацию оптической плотности проводили при непрерывном подъеме температуры со скоростью $\sim 0,3$ град/мин, уменьшение интервала перехода до $5-6^{\circ}$ могло отвечать неравновесному характеру процесса.

Действительно, при остановке подъема температуры (например, при 40% денатурации) дальнейшего плавления ДНК в водно-солевой среде не происходит (рис. 5, 5), а в присутствии дибромэтилацетата мы наблюдали дальнейшее повышение оптической плотности (рис. 4).

Так же наглядно кинетический характер процесса проявляется на кривой изменения вязкости ДНК от времени (рис. 6, 7). При добавлении модифицирующего агента к ДНК при температуре 74°, соответствующей ~20% денатурации, первые 10–15 мин вязкость раствора не изменяется — иными словами, модификация доступных оснований в частично денатурированной ДНК не приводит к дальнейшим изменениям конформации молекулярного клубка ДНК. Через 15 мин вязкость раствора начинает падать, причем это падение не может быть объяснено деструкцией ДНК при соответствующих температурах, поскольку скорость деструкции намного меньше. Это следует из рис. 5 (кривые 3, 4), на котором приведена кривая температурного изменения вязкости в тех же солевых условиях, что и на рис. 6. Конечный уровень падения вязкости (рис. 6) составляет ~3 дл/г, что хорошо соответствует значению вязкости того же препарата ДНК, но полностью денатурированного в обычных условиях тепловой денатурации (рис. 5).

На рис. 5, 6 (врезки) приведены зависимости, характеризующие взаимное расположение кривой изменения вязкости и доли модифицированного остатка цитозина (или оптической плотности). Как было отмечено ранее [8], расположение кривой в координатах, использованных на рис. 5 и 6, свидетельствует о характере распределения нативных и денатурированных участков в частично денатурированных молекулах ДНК. Так, для ДНК фага T2, которая в интервале плавления содержит чередующиеся спиральные и клубкообразные участки, кривая имеет отчетливо выпуклый характер, а для ДНК животных, у которых при каждой температуре наблюдается смесь молекул в разных состояниях (нативном, денатурированном и частично денатурированном), кривая близка к биссектрисе.

Поскольку на рис. 5 представлены кривые денатурации животной ДНК в водно-солевой среде, то, как уже наблюдалось для ДНК тимуса телят [8], кривые относительного изменения вязкости и плавления практически совпадают (точки на врезке рис. 5 близки к биссектрисе). Аналогичный характер расположения точек мы наблюдаем и на врезке рис. 6. Если вспомнить, что здесь имеет место не температурное плавление (как на рис. 5), а расплетание ДНК дибромэтилацетатом, то следует признать, что инициация новых центров при расплетании происходит с меньшей скоростью, чем рост уже образованных денатурированных областей.

Таким образом, наряду с модификацией остатков цитозина и аденина в денатурированных областях ДНК дибромэтилацетат «расплетает» нативную структуру, по всей видимости, с концов спиральных участков. В противном случае, т. е. при инициации новых центров расплетания, мы должны были наблюдать в координатах рис. 6 выпуклую кривую. Расплетание нативных участков происходит со скоростью, в 7–10 (по цитозину) и в 4–5 раз (по аденину) меньшей, чем модификация соответствующих оснований в денатурированных областях.

Зависимость константы скорости расплетания ДНК от степени денатурации. Представляет интерес выяснить, зависит ли скорость расплетания ДНК от состояния молекулы. Типичные кривые расплетания ДНК для двух состояний приведены на рис. 7а. Имея набор подобных кривых при начальных степенях денатурации ДНК 5–70%, мы построили зависимость константы скорости расплетания от состояния ДНК (рис. 8).

Характер кривой в области степеней денатурации 15–60% говорит о том, что в этом интервале не происходит существенного увеличения количества денатурированных участков за счет, вероятно, компенсации двух факторов — возникновения новых мест денатурации при повышении температуры и слияния уже образованных мест за счет их разрастания.

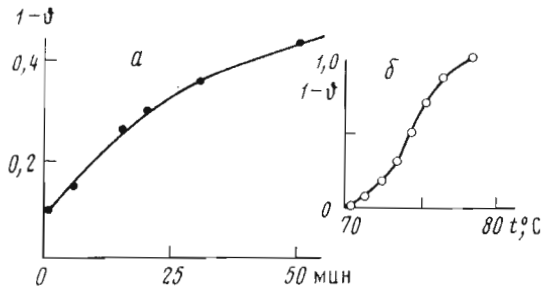


Рис. 4. Изменение степени денатурации ДНК в присутствии дибромэтилацетата при температуре 71° (а) и кривая плавления ДНК в том же растворе, зарегистрированная при непрерывном подъеме температуры со скоростью $\sim 0,3^\circ\text{C}/\text{мин}$ (б)

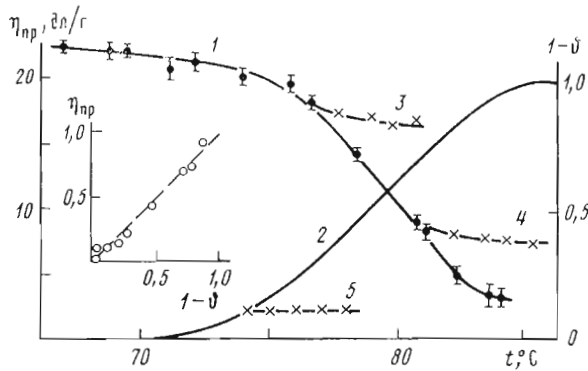


Рис. 5. Температурная зависимость приведенной вязкости (1) и степени денатурации (2) ДНК эритроцитов цыпленка в водно-солевом буфере (рН 4,9) в отсутствие дибромэтилацетата. Временные зависимости $\eta_{пр}$ (3, 4) и поглощения (5) в интервале времени 0–50 мин измерены на отдельных порциях ДНК. На врезке – зависимость относительного изменения вязкости ($\eta_{пр}$, относит. единицы) от степени денатурации ДНК

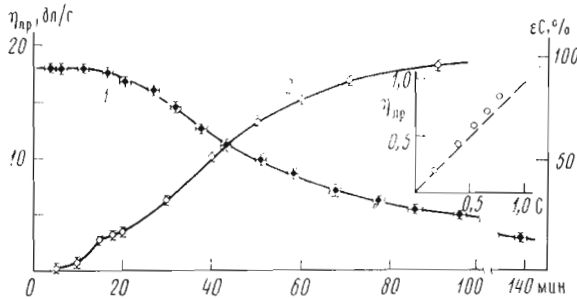


Рис. 6. Изменение приведенной вязкости (1) и количества модифицированного цитозина (2) при добавлении дибромэтилацетата к ДНК при температуре 74° ($\sim 20\%$ денатурации). На врезке – зависимость изменения вязкости от доли $\epsilon\text{С}$ (приведены относительные единицы)

Такая ситуация не удивительна, поскольку при плавлении квазислучайной последовательности, из которой состоят фрагменты ДНК, максимальное изменение средней длины спирального участка, ограниченного двумя денатурированными областями, наблюдается в области степеней денатурации до 15–20% [9], в дальнейшем длина меняется незначительным образом.

Резкое снижение константы скорости в области высоких степеней денатурации на рис. 8 отвечает, по-видимому, возросшим стерическим препятствиям для расплетания вследствие ограниченной доступности относительно компактной структуры молекулярного клубка ДНК для дибромэтилацетата в буфере с высоким содержанием соли. Это подтверждается тем фактом, что при увеличении содержания соли в растворе (с 0,14 до 0,2 М Na⁺) область плато для констант скорости расплетания заканчивается при меньших степенях денатурации. К тому же даже для полностью денатурированной ДНК, очевидно, не происходит расхождения нитей, о чем свидетельствует значительное превышение вязкости денатурированной ДНК (рис. 5, 6) по сравнению с ожидаемым значением ~ 1 дл/г для однонитевой ДНК исходного молекулярного веса. В то же время при малых степенях денатурации мы наблюдаем уменьшение константы скорости расплетания в соответствии с увеличением расстояния между денатурированными областями.

Небольшая скорость расплетания ДНК при температурах 70–80°, т. е. в интервале перехода, делает дибромэтилацетат удобным агентом для выведения оценок, связанных со структурой частично денатурированной ДНК (число и состав расплавленных областей, длина спирального участка). В нашем случае ситуация выглядит более простой, чем при использовании для расплетания ДНК формальдегида. В самом деле, как следует из теории кинетического формальдегидного метода [10], изменение степени спиральности θ при расплетании ДНК может быть выражено соотношением $\theta = \exp[-(2Cv + \rho vt)t]$. Перестроение кинетических кривых в линейные анаморфозы позволяет определить параметр $2Cv$ (произведение начальной концентрации дефектов C на скорость расплетания v , которая определяется из градуировки), а наклон анаморфозы пропорционален ρ — константе скорости инициации зародышей деспирализации. На рис. 7б изображены линейные анаморфозы кривых расплетания ДНК с помощью дибромэтилацетата при степенях денатурации ~ 15 и 50%. Незначительный наклон анаморфоз свидетельствует о том, что величина ρ для этого реагента сравнительно мала — иными словами, расплетание происходит в основном с предсуществующих дефектов, что согласуется с выводом, который был сделан нами на основании анализа кривой изменения вязкости при расплетании ДНК (рис. 6).

Для градуировки мы использовали ДНК, фрагментированную гидродинамически до молекулярного веса $\sim 2 \cdot 10^6$ с помощью шприца. Отсутствие однонитевых разрывов в градуировочной ДНК следовало из измерений методом определения вязкости молекулярного веса однонитевой ДНК, полученной денатурацией при низкой ионной силе раствора.

Сравнивая значение k_c $0,63 \cdot 10^{-2}$ мин⁻¹ для градуировочной ДНК и k_c $1,9 \cdot 10^{-2}$ мин⁻¹ в области плато для частично денатурированной ДНК (рис. 8), мы определили, что средняя длина спирального участка в середине интервала плавления составляет $1-1,3 \cdot 10^3$ пар (разброс значений связан с ошибкой определения молекулярного веса ДНК). Нам представляется естественным, что эта величина превышает значение ~ 500 пар в середине интервала плавления, предсказуемое теорией перехода спираль — клубок для гетерополинуклеотида со случайной последовательностью [9] и оцененное экспериментально для ДНК фага T2 [6]. Животная ДНК — пример последовательности нуклеотидных пар с блочным, а не квазислучайным характером распределения [8], вследствие чего блоки размером $\sim 10^7$ пар с относительно высоким средним (G+C)-составом, со-

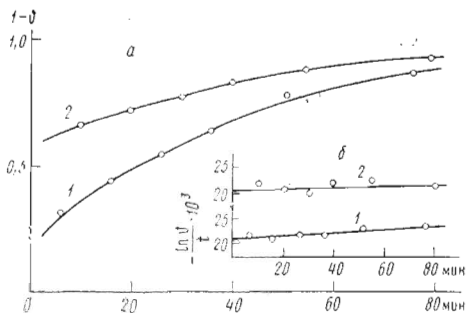


Рис. 7

Рис. 7. Кинетика расплетания ДНК (74°) под действием дибромэтилацетата после 15 мин инкубации смеси при 74° (1) и $77,6^\circ$ (2) — а и линейные анаморфозы тех же кривых — б

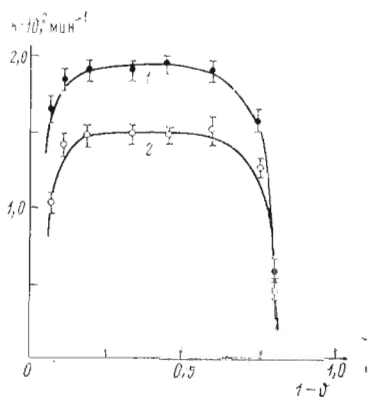


Рис. 8

Рис. 8. Зависимость констант скорости расплетания ДНК от степени денатурации, вычисленные для εС (1) и εА (2)

храняющие свою нативную структуру вплоть до самых высоких степеней денатурации, должны внести свой вклад в определяемый средний размер спирального участка в интервале плавления.

Совокупность приведенных результатов показывает, что модификация остатков аденина и цитозина с помощью дибромэтилацетата может быть успешно использована не только для прямого определения состава оснований в деспирализованных участках ДНК и их фиксации для электронно-микроскопической визуализации, но при соответствующей экспериментальной разработке и для оценки как степени сгруппированности оснований в денатурированных областях, так и количества дефектных участков различных ДНК.

Экспериментальная часть

Модификацию, гидролиз и хроматографию препаратов ДНК проводили, как описано в работе [1]. Измерение константы скорости расплетания ДНК в различных состояниях, с тем чтобы избежать неоднозначности, связанной с влиянием различных температур, при которых достигается различная степень денатурации ДНК, проводили по процедуре, описанной ниже. При температурах, соответствующих заданным, частично денатурированным состояниям ДНК, реакцию модификации вели в течение 15 мин, затем смесь охлаждали до 74° (или $71,5^\circ$ в другой серии опытов) и при этой температуре регистрировали все кривые расплетания. Дальнейшее снижение температуры расплетания было нежелательно, так как время достижения полного расплетенного состояния значительно увеличивается (при 69° , например, до 10—15 ч).

Методика измерений вязкости ДНК в интервале перехода спираль — клубок на магнитном ротационном вискозиметре Зимма — Кросерса описана ранее [11].

Препараты ДНК для электронной микроскопии после модификации в течение 15 мин при соответствующих температурах и охлаждения в ледяной бане готовили по методике Кляйншмидта [12] и оттеняли Pt под углом 7° . Работу проводили на электронном микроскопе типа JEM-7.

ЛИТЕРАТУРА

1. Личина М. В., Шугалий А. В., Гвоздев Р. И., Тодоров И. Н. (1979) Биоорг. химия, 5, 664-670.
2. Кочетков Н. К., Шлибаев В. Н., Кост А. А. (1972) Докл. АН СССР, 205, 100-103.
3. Личина М. В., Шугалий А. В., Черный Д. И., Тодоров И. Н. (1978) Докл. АН СССР, 243, 516-519.
4. Felsenfeld G., Sandeen G. (1962) J. Mol. Biol., 5, 587-600.
5. Lee C. H., Wetmur J. J. (1973) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 50, 879-885.
6. Шугалий А. В., Мавяков В. Ф., Герман А. В. (1972) Молекулярн. биология, 6, 902-907.
7. Vologodskii A. V., Frank-Kamenetskii M. D. (1975) J. Theor. Biol., 55, 153-166.
8. Шугалий А. В., Франк-Каменецкий М. Д., Лазуркин Ю. С. (1970) Молекулярн. биология, 4, 275-283.
9. Веденов А. А., Дыхне А. М., Франк-Каменецкий М. Д. (1971) Успехи физ. наук, 105, 479-519.
10. Трифонов Э. Н., Шафрановская Н. Н., Франк-Каменецкий М. Д., Лазуркин Ю. С. (1968) Молекулярн. биология, 2, 887-895.
11. Шугалий А. В., Франк-Каменецкий М. Д., Лазуркин Ю. С. (1969) Молекулярн. биология, 3, 133-145.
12. Kleinschmidt A. K. (1968) Methods in Enzymology, vol. 12B, pp. 361-379, Acad. Press, N. Y.

Поступила в редакцию
11.X.1978

DNA MODIFICATION BY DIBROMOETHYLACETATE. II. THE FIXATION OF DENATURED AND UNWINDING OF HELICAL REGIONS

LICHINA M. V., SHUGALIY A. V., TODOROV I. N., CHERNY D. I.

Department of the Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Chernogolovka; Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Dibromoethylacetate modification of partially denatured DNA has been studied over the helix-coil transition range. The curve describing the extent of modification has a two-step character, the first step being attributed to modification of accessible cytosine and adenine residues in molten regions, and the second one to unwinding of helical regions. The GC-content of molten regions at the early stages of denaturation is far from the mean GC-content of DNA, amounting to 20% at 5% denaturation. The possibility of using dibromoethylacetate as a fixing agent for electron microscopy of DNA in partially denatured state is demonstrated. Unwinding of DNA helical regions apparently occurs from the ends of these regions, without initiation of new centers of destabilisation. The rate constant of unwinding is 4-10 times less than the rate constants of cytosine and adenine modification in the molten regions. The average length of DNA helical region is estimated for the midpoint of the helix-coil transition.