



мет

УДК 577.113.4

РАСЩЕПЛЕНИЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ ДНК ПО ОСТАТКАМ Т, ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫХ — ПО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ ТА, TG, TC ПРИ ДЕЙСТВИИ NaNH_4 .

УВЕЛИЧЕННАЯ РЕАКЦИОННОСПОСОБНОСТЬ ЦЕНТРАЛЬНОГО Т В БОКСЕ ПРИБНОВА РЯДА ПРОМОТОРОВ

Свердлов Е. Д., Калинин Н. Ф.

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

Одним из возможных путей узнавания регуляторных участков ДНК специфическими белками является нахождение ими стереохимических особенностей этого участка, отличающих его от других последовательностей. Вопрос о степени стереохимических отличий однотипных пар оснований в ДНК друг от друга в зависимости от окружения с этой точки зрения представляет несомненный интерес. Такие отличия могут существовать постоянно или возникать с различной частотой при флуктуациях различных пар. В попытках ответить на этот вопрос мы исследуем реакционную способность оснований в двухцепочечных ДНК по отношению к химическим реагентам, чувствительным к изменению конформаций ДНК.

Принцип такого исследования заключается в том, что меченный по одному из концов двухцепочечный фрагмент ДНК модифицируется в условиях неполной модификации реагентом, способным дискриминировать конформационные изменения и обеспечивающим возможность специфического расщепления ДНК по модифицированным звеньям (схема).

В процессе поиска таких реагентов мы обнаружили, что после обработки одноцепочечных ДНК боргидридом натрия и затем пиперидином полинуклеотидная цепь специфически расщепляется по тимидиновым звеньям (рис. 1). Степень расщепления практически не зависит от последовательности. Однако при модификации двухцепочечных ДНК расщепление происходит только по тимидиновым звеньям, находящимся в последовательностях TG, TC, TA (рис. 2а, б).

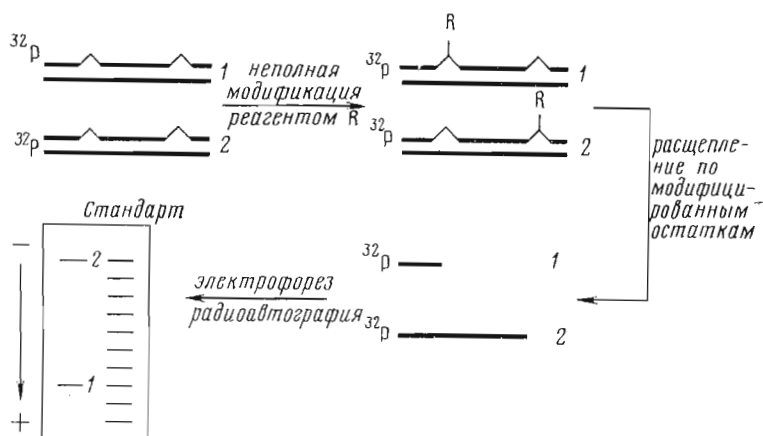


Схема использования химических реагентов (R) для исследования конформационных особенностей ДНК. Двойные линии обозначают две нити ДНК, а не прямые участки на верхней линии — отклонения от обычной конформации. Реагент взаимодействует с участками с измененной конформацией с существенно большей скоростью, чем с обычной дуспиральной ДНК

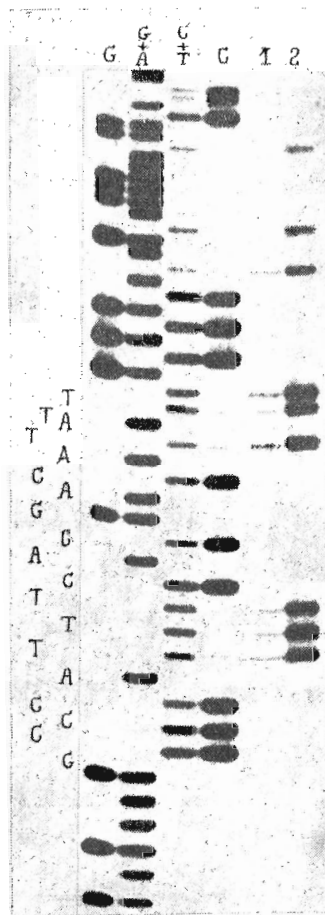


Рис. 1. Расщепление одноцепочечного фрагмента ДНК после обработки боргидридом натрия. Слева указана последовательность фрагмента. Колонки 1 и 2 представляют продукты расщепления после модификации NaBH_4 при pH 9,3 и концентрации реагента 0,5 и 1,0 М соответственно. Колонки: G — расщепление после модификации диметилсульфатом [5], A+G — расщепление после апуринизации муравьиной кислотой [6], C+T и C — расщепление после модификации гидразином и гидразином в присутствии 4 М NaCl соответственно [5]

Поскольку 5'-концевые тимидины в последовательностях ТТ не затрагиваются, можно сделать вывод, что модификация двухцепочечных ДНК не включает в качестве промежуточного этапа образование локально денатурированных достаточно протяженных участков ДНК, как это предполагается для случаев изотопного обмена [1] или реакции с формальдегидом [2]. Различная реакционная способность тимидинов в зависимости от окружения отражает их различную экспонированность и, следовательно, дает основания рассматривать стереохимические факторы как возможный источник дискриминации различных участков ДНК.

При исследовании относительной реакционной способности различных А·Т-пар в промоторах мы изучили модификацию двух двухцепочечных промоторных фрагментов, содержащих промоторы *lacUV5* *E. coli* (рис. 2а) и P_0 фага λ (рис. 2б). Основной закономерностью, обнаруженной в этих случаях, является очень интенсивная модификация центрального тимидина (отмечен) в боксах Прибнова обоих промоторов (ТАТ^{*}ААТ в случае *lacUV5* и САТ^{*}ААТ в случае P_0). Этот факт свидетельствует об их существенно большей экспонированности по сравнению с другими реакционноспособными тимидинами. Возможно, это играет роль при расплетании участка ДНК, включающего бокс Прибнова, при образовании открытых комплексов РНК-полимеразы с этими промоторами.

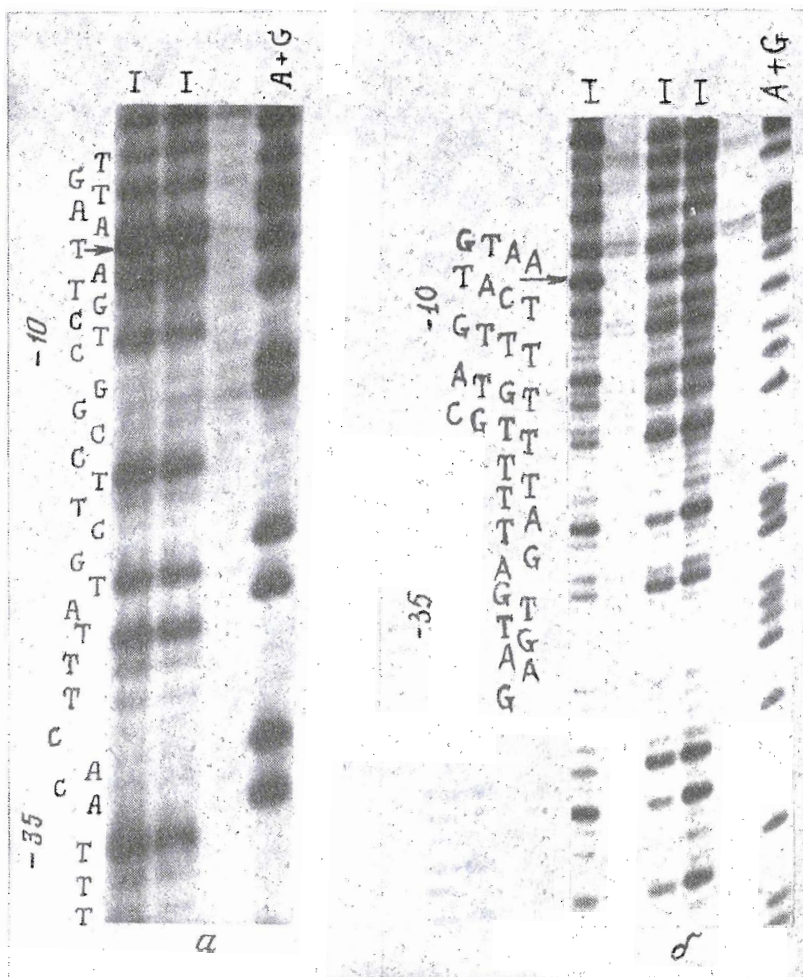


Рис. 2. Результаты расщепления двухцепочечных промоторных фрагментов после обработки NaBH_4 . *a* — *lacUV5*-промотор *E. coli*, *b* — P_0 -промотор фага λ . Колонка 1 — продукты расщепления после модификации 1,5 М NaBH_4 при pH 10. Колонка G+A — продукты расщепления после обработки муравьиной кислотой. Центральный тимидин бокса Прибнова указан стрелкой

Экспериментальная часть

10 пмоль двухцепочечного фрагмента ДНК метили ^{32}P с помощью $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и полинуклеотидкиназы бактериофага T4 (КФ 2.7.1.78) [3], цепи разделяли электрофорезом в ПААГ [4], элюировали и осаждали этанолом [5]. Осажденные индивидуальные цепи растворяли в 25 мкл 0,1 М бикарбоната аммония, pH 8–10. К полученному раствору добавляли 25 мкл 2 М водного раствора NaBH_4 до конечной концентрации 1,0 М. Смесь инкубировали 10–60 мин при 37°C , после чего ДНК осаждали этанолом, 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 ^{32}P -меченых олигонуклеотидов разделяли ПААГ. Модификацию двухцепочечных фрагментов проводили при концентрации NaBH_4 1–1,5 М и pH 10,0.

ЛИТЕРАТУРА

1. Patel D. J., Kozlowski S. A., Rice J. A., Marky L. A., Breslauer K. J., Broka C., Itakura K. Topics in Nucleic Acid Structure / Ed. Neidle S. Gresham Press, 1981, part 2, p. 81–136.
2. von Hippel P. H., Wong K. Y. J. Mol. Biol., 1971, v. 61, № 3, p. 587–613.
3. Panet A., Van de Sande J. H., Loewen P. C., Khorana H. G., Raae A. J., Lillehaug J. R., Kleppe K. Biochemistry, 1973, v. 12, № 25, p. 5045–5049.

4. Szalay A. A., Grohmann K., Sinsheimer R. L. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 5, p. 1569-1578.
 5. Maxam A., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560-564.
 6. 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
10.XI.1983

**NABH₄ CLEAVAGE OF SINGLE-STRANDED DNA AT T RESIDUES,
 DOUBLE-STRANDED DNA AT SEQUENCES TA, TG AND TC. ENHANCED
 REACTIVITY OF CENTRAL T IN THE PRIBNOW BOX OF A NUMBER OF
 PROMOTERS**

SVERDLOV E. D., KALININA N. F.

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

Upon treatment of single-stranded DNA fragments with sodium borohydride and the following cleavage with piperidine, the specific and uniform cleavage at thymidine units is observed that can be used for their localization. On modification of double-stranded DNA fragments the cleavage is observed only for thymidine units in sequences TA, TG, TC, whereas 5'-terminal thymidines in sequences TT are not affected. In promoters *lacUV5* from *E. coli* and P₀ of phage λ the central thymidines appeared to be most reactive in the Pribnow box. Irregularity of thymidine modification in double-stranded DNA evidences that, firstly, the modification does not involve intermediate local denaturation and, secondly, exposure of similar base pairs in different sequences varies and can serve as a discrimination factor at the DNA interactions with specific proteins.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 20.12.83 Подписано к печати 31.01.84 Т-05016 Формат бумаги 70×108^{1/16}
 Высокая печать Усл. печ. л. 12,8 Усл. кр.-отт. 11,1 тыс. Уч.-изд. л. 13,5 Бум. л. 4,9
 Тираж 862 экз. Зак. 3495

Издательство «Наука». 103717 ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21
 2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Шубинский пер., 10