



УДК 547.963.32.02

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА НЕПОЛНОЙ АПУРИНИЗАЦИИ В ОПРЕДЕЛЕНИИ КОНЦЕВЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК *

Свердлов Е. Д., Левитан Т. Л.

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

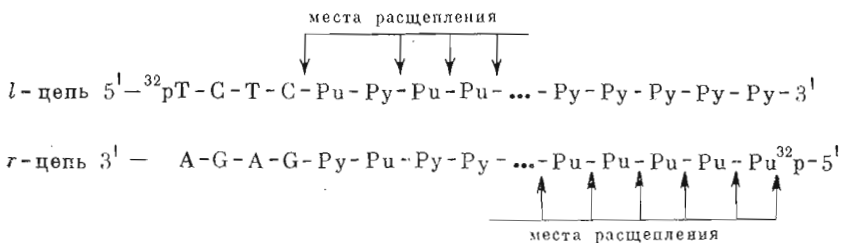
Методом неполной специфической апуринизации и расщеплением по апуриновым звеньям определена 5'-концевая последовательность *l*-цепи ДНК фага T7-d (pT-C-T-C-Pu-Py-Pu-Pu...), что согласуется с опубликованными ранее данными и подтверждает возможность использования метода в анализе структуры ДНК.

Ранее [1, 2] был предложен принцип установления последовательности олигонуклеотидов, основанный на определении длины концевых продуктов, образующихся при неполном специфическом расщеплении. В этой работе один из методов, основанных на этом принципе, — неполная апуринизация и расщепление по апуриновым звеньям [2] — использован для изучения положения пуриновых (и соответственно пиримидиновых) звеньев в 5'-концевых участках ДНК фага T7.

Метод включает в себя следующие этапы (схема):

1) в 5'-концевые звенья ДНК с помощью полинуклеотидкиназы и [γ - 32 P]АТР вводятся меченные 32 P фосфатные группы;

2) ДНК подвергают неполному расщеплению по пуриновым звеньям путем кратковременной обработки смесью муравьиной кислоты и дифениламина;



| 66% HCOOH,
| 2% дифениламин,
| 30°, 30 мин

Меченные 32 P продукты неполного расщепления	{	32 pT-C-T-Cp	32 p
		32 pT-C-T-C-Pu-Pup	32 pPup
		32 pT-C-T-C-Pu-Py-Pup	32 pPu-Pup
		32 pT-C-T-C-Pu-Py-Pu-Pup	32 pPu-Pu-Pup.
		

* Все нуклеотиды, обсуждаемые в этой статье, принадлежат дезоксирияду, поэтому префикс d для краткости всюду опускается. Pu и Py — неизвестные пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды соответственно.

3) длины образующихся меченых ^{32}P олигонуклеотидов определяются путем совместной ионообменной хроматографии со смесью олигонуклеотидов различной длины в условиях разделения по зарядам.

ДНК фага T7 характеризуется различным распределением пуриновых и пиримидиновых звеньев на 5'-концах *r*- и *l*-цепей. *r*-Цепь содержит на 5'-конце пуриновый пентануклеотид [3], тогда как *l*-цепь — пиримидиновый тетрапентануклеотид Т-С-Т-С [4, 5]. Это обстоятельство позволяет определять распределение пуринов и пиримидинов на 5'-конце *l*-цепи без разделения комплементарных нитей. При неполном расщеплении ДНК, меченой ^{32}P по 5'-концевым звеньям, должны образовываться две серии меченных ^{32}P концевых продуктов, соответствующих двум цепям ДНК (схема). При этом самым коротким продуктом, образующимся из *l*-цепи, должен быть тетрапентануклеотид ^{32}P -Т-С-Т-Ср, а из *r*-цепи — неорганический фосфат.

В каждой серии относительное содержание продуктов должно последовательно убывать с увеличением длины, поскольку выход каждого продукта определяется произведением вероятности расщепления данной связи и нерасщепления предыдущих. Если считать, что вероятности расщепления связей, соединяющих пуриновые звенья, примерно одинаковы и равны « x » ($x < 1$), то выход самого короткого из возможных фрагментов в каждой серии равен x , а следующих — $x(1-x)$, $x(1-x)^2$, . . . , $x(1-x)^n$, где n — число способных к расщеплению связей, предшествующих расщепляемой.

Наибольшая доля радиоактивности в продуктах расщепления *r*-цепи будет содержаться в неорганическом фосфате и должна монотонно убывать (см. схему). В продуктах расщепления *l*-цепи наибольшее количество метки должно содержаться в тетрапентануклеотидах и далее убывать. Если метка в концевых звеньях обеих цепей примерно одинакова, то радиоактивность тетрапентануклеотида и неорганического фосфата из *l*-цепи должна быть примерно одинакова и значительно превышать радиоактивность три- и тетрапентануклеотидов из *r*-цепи. В целом количество меченых олигонуклеотидов с длиной > 4 из *l*-цепи должно значительно превышать количество соответствующих олигонуклеотидов из *r*-цепи. Две серии продуктов легко дифференцировать.

На рис. 1 и 2 представлены результаты разделения по длине цепи продуктов полного и неполного расщепления меченой ^{32}P ДНК фага T7. При этом одновременно фиксировалась оптическая плотность и радиоактивность фракций. Оптическая плотность обусловлена присутствием смеси всех олигонуклеотидов, получающихся при расщеплении ДНК, и ее изменения соответствуют разделению последовательно удлиняющихся на одно звено нуклеотидов, начиная с мононуклеотидов. Радиоактивность обусловлена концевыми продуктами. Совпадение места выхода пика радиоактивности с определенным пиком оптической плотности определяет длину концевых продуктов. В полученной картине (рис. 2) легко видеть ожидаемые две серии пиков радиоактивности. Первый из них выходит в самом начале элюции до появления пика мононуклеотидов и соответствует, очевидно, неорганическому фосфату из *r*-цепи. Три следующих монотонно убывающих пика радиоактивности соответствуют моно-, ди- и трипентануклеотидам и обусловлены пуриновыми нуклеотидами, образующимися из *r*-цепи (схема).

Резкое возрастание радиоактивности наблюдается во фракции, соответствующей тетрапентануклеотидам, в которой элюируется концевой тетрапиримидиновый олигонуклеотид из *l*-цепи. Фракции пентануклеотидов практически не мечены. Это означает, что в 6-м положении (считая с 5'-конца) *l*-цепи содержится неспособное к расщеплению пиримидиновое звено. Два следующих пика радиоактивности наблюдаются во фракциях гекса- и гептануклеотидов и показывают, что в 7-м и 8-м положениях с 5'-конца *l*-цепи содержатся пуриновые звенья. Таким образом, можно сде-

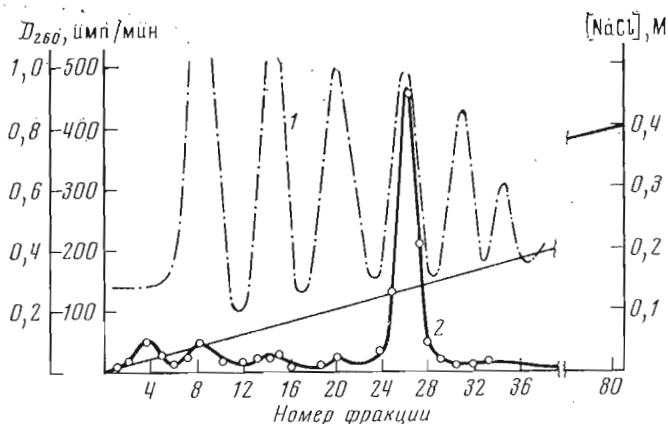


Рис. 1. Хроматография полного гидролизата ДНК по методу Бартона на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации NaCl: 1 — УФ-поглощение, 2 — радиоактивность

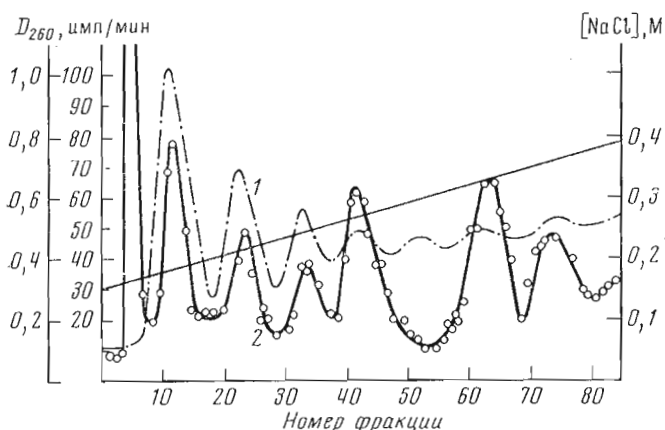


Рис. 2. Хроматография неполного гидролизата ДНК на DEAE-сефадексе в градиенте концентрации NaCl: 1 — УФ-поглощение, 2 — радиоактивность

лать вывод, что 5'-концевая последовательность γ -цепи представлена по крайней мере тремя пуриновыми звеньями — рPu-Pu-Pu-..., что подтверждает данные других авторов [3, 4], тогда как 5'-концевая последовательность l -цепи — рТ-С-Т-С-Пу-Пу-Пу-... Полученная последовательность согласуется с недавно опубликованными данными по структуре 5'-концевых участков ДНК [4].

Метод определения положения пуриновых и пиримидиновых звеньев в олигонуклеотидах и концевых участках полинуклеотидов чрезвычайно прост, доступен и требует минимальных количеств материала. Он является одним из методов, основанных на общем принципе определения длины продуктов неполных специфических расщеплений [1, 2, 6], совокупность которых дает возможность установления полной структуры длинных олигонуклеотидов. Метод может быть использован в качестве первого этапа структурного анализа различных олигонуклеотидов.

Экспериментальная часть

Методы получения и очистки бактериофага T7 и его ДНК, дефосфорилирования ДНК и введения концевой ^{32}P фосфатной группы с помощью $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и полинуклеотидкиназы фага T4 опубликованы ранее [5].

Полное расщепление меченой ДНК проводили по методу Бартона [7]. 70 ОЕ полностью расщепленной смеси ДНК фага Т7 и эритроцитов цыпленка наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (Cl-форма, $0,3 \times 13$ см) (рис. 1). Колонку промывали 0,05 М ацетатом калия в 7 М мочеvine (рН 5,5) и вещества элюировали линейным градиентом NaCl ($0 \rightarrow 0,4$ М) в 7 М мочеvine в 0,05 М ацетатном буфере, рН, 5,5, при 20°. После разделения определяли оптическую плотность и радиоактивность фракций [5].

Неполное расщепление ДНК. К 9 мл раствора, содержащего 1,5 ОЕ ^{32}P -меченой ДНК, добавляли 240 ОЕ денатурированной ДНК из эритроцитов цыпленка (Reanal, Венгрия) в 4 мл воды, ДНК осаждали 50% трихлоруксусной кислотой, осадок промывали холодным спиртом и эфиром, растворяли в 1 мл воды. К смеси добавляли 2,84 мл 3% раствора дифениламина в 85% муравьиной кислоте. Смеси инкубировали 30 мин при 30°, разбавляли двумя объемами ледяной воды и экстрагировали при 0° эфиром до тех пор, пока значение рН смеси не достигало 5. 240 ОЕ не полностью расщепленной смеси ДНК фага Т7 и эритроцитов цыпленка наносили на колонку с DEAE-сефадексом А-25 (Cl-форма, coarse, Pharmacia, $0,3 \times 13$ см) (рис. 2). Колонку промывали 7 М мочеvineй, содержащей 5 мМ Трис-НСl-буфер, рН 7,6, и элюировали при 60° линейным градиентом NaCl ($0,15 \rightarrow 0,5$ М) в 7 М мочеvine в 5 мМ Трис-НСl-буфере, рН 7,6. В полученных фракциях определяли оптическую плотность и радиоактивность.

Авторы выражают глубокую благодарность проф. Э. И. Будовскому, в лаборатории которого была выполнена эта работа, за постоянную поддержку, интерес и помощь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sverdlov E. D., Monastyrskaya G. S., Budowsky E. I., Grachev M. A. (1972) FEBS Lett., 28, 231—235.
2. Sverdlov E. D., Monastyrskaya G. S., Chestukin A. V., Budowsky E. I. (1973) FEBS Lett., 33, 15—17.
3. Englund P. T. (1972) J. Mol. Biol., 66, 209—224.
4. Loewen P. C. (1975) Nucleic Acid Res., 2, 839—852.
5. Свeрдлов Е. Д., Левитан Т. Л. (1976) Биоорг. химия, 2, 370—374.
6. Свeрдлов Е. Д. (1975) в сб. Итоги науки и техники. Молекулярная биология (под ред. Л. Л. Киселева), т. 4, с. 7—88, ВИНТИ, М.
7. Burton K., Petersen G. B. (1960) Biochem. J., 75, 17—27.

Поступила в редакцию
24.VI.1976

THE USE OF INCOMPLETE APURINIZATION FOR DETERMINATION OF THE TERMINAL DNA SEQUENCES

SVERDLOV E. D., LEVITAN T. L.

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

The phage T7 DNA after introduction of ^{32}P into 5'-terminal nucleoside residues was partially apurinated by means of diphenylamine-formic acid. The length of the labeled fragments, determined by chromatography on DEAE-sephadex, allowed to propose the following 5'-terminal sequence for the *l*-chain of the phage T7 DNA, namely d(pT-C-T-C-Pu-Py-Pu-Pu).