

<https://doi.org/10.3176/biol.1984.4.07>

УДК 547.963.32

Кадри ЯРВЕ, Елена ЦЫМБАЛОВА,  
Александр СЕРЕБРЯНЫЙ

## ОСНОВНЫЕ ПРОДУКТЫ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ЯЧМЕНЯ НИТРОЗОМЕТИЛМОЧЕВИНОЙ

В последние годы отмечается существенный прогресс в изучении первичных стадий мутационного процесса у животных и микроорганизмов. Установлено, что при действии всех алкилирующих агентов, в том числе и нитрозоалкилмочевин, основным продуктом алкилирования оснований ДНК является 7-алкилгуанин, однако появление этого основания в цепи ДНК не является предмутационным изменением, так как присутствие его не вызывает ошибок ни при репарации, ни при репликации ДНК. Основным предмутационным изменением ДНК является  $O^6$ -алкилированный гуанин ( $O^6$ -алкГ). Предмутационными повреждениями, вероятно, являются и другие  $O$ -алкилированные основания:  $O^2$ -алкилцитозин,  $O^2$ - и  $O^4$ -алкилтиамины, образующиеся с существенно меньшим, чем  $O^6$ -алкГ выходом, а также и некоторые другие минорные модифицированные основания (Singer, 1979).

На этом фоне следует отметить некоторое отставание в исследовании мутационного процесса у растений. В противоположность тому, что известно для животных и микроорганизмов, у растений неизвестен набор возникающих повреждений ДНК после действия алкилирующих агентов. Показано лишь, что после действия  $N$ -нитрозо- $N$ -метилмочевины (НММ) в цепи возникают 7-метилгуаниновые (7 мег) звенья (Velevinsky и др., 1972). Настоящая статья посвящена исследованию модификации ДНК в семенах ячменя, обработанных *in vivo* НММ, меченой радиоактивным углеродом по метильной группе ( $^{14}CH_3$ -НММ).

### Методика

$^{14}CH_3$ -НММ была синтезирована по методу Арндта (Арндт, 1949) и имела удельную активность 2,3 мКи/ммоль.

$O^6$ -Мег и 7-Мег были получены при реакции дезоксигуанозина с диазометаном (Friedmann и др., 1965).

Концентрацию белка определяли по методу Лоури (Lowry и др., 1951).

Концентрацию РНК определяли по методу Леви — по кислоторастворимой фракции после щелочного гидролиза препарата (Lewy и др., 1972).

Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически.

Измерение радиоактивности. Радиоактивность жидких проб измеряли в диоксановом сцинтилляторе (Gray, 1960), радиоактивность бумажных хроматограмм после их разрезания на куски (1×2 см) — в толуольном сцинтилляторе (Kobayashi, Maudsley, 1974).

Гель-фильтрацию проводили на колонке 1,8×90 см с сефадексом G-10 (Pharmacia, Швеция). Элюент — вода (100 мл/ч).

**Хроматография на бумаге.** Использовалась бумага ватман 2 (W. R. Bals-ton Ltd., Англия) и следующие системы растворителей (системы нисходящие):

а) *t*-бутанол—метилэтилкетон—концентрированный раствор аммиака—вода (4:3:2:1, по объему)

б) *n*-пропанол—концентрированный раствор аммиака—вода (6:3:1, по объему).

$R_f$  для 7-МеГ в первой системе — 0,4, во второй — 0,32; для О<sup>6</sup>-МеГ соответственно 0,67 и 0,60.

**Обработка семян.** 120 г семян ячменя сорта «Мийна» инкубировали в 150 мл 3 или 1 мМ раствора <sup>14</sup>СН<sub>3</sub>-НММ в 0,2 М фосфатном буфере рН 7,0 или фосфатно-цитратном буфере рН 5,0 в течение 24 ч при комнатной температуре. Семена промывали проточной водой 0,5 ч, отделяли зародыши (4,5—5,0 г) и замораживали (—20 °С).

#### **Выделение ДНК:**

а) фенольный метод (модификация Кораблевой и Ладыженской, 1975). 5 г зародышей обезжиривали эфиром, растирали в агатовой ступке и экстрагировали последовательно 15 мл растворов: 1% додецилсульфат натрия (ДДС)+0,15 М NaCl+0,1 М ЭДТА (рН 7); 2% ДДС+0,15 М NaCl+0,1 М ЭДТА (рН 6); 5% ДДС+0,15 М NaCl+0,1 М ЭДТА (рН 8). Каждый раз экстракт встряхивали с свежеперегранным 80%-ным фенолом равного объема (рН фенола доводили до 7,0 0,2 М *трис*-НСl). Водный слой отделяли центрифугированием (20 мин при 9000 G). Водные слои всех экстрактов соединяли и осаждали этанолом ДНК, растворяли в 3 мл 0,15 М NaCl и обрабатывали РНКазой 1 (Worthington, США; 100 мкг/мл, рН 5 в течение 1 ч при 37°, предварительная инкубация раствора РНКазы: 10 мин при 80°) и проназой E (Merck, ФРГ, 200 мкг/мл, рН 8, 2 ч при 37°). Ферменты удаляли путем двух-трехкратной депротеинизации смесью хлороформ — изоамиловый спирт (96:4). ДНК переосаждали изопропанолом (0,54 объема) и растворяли в 2 мл 0,015 М NaCl;

б) цетавлоновый метод (Сулимова и др., 1976; Нактинис и др., 1977). 5 г зародышей растирали, как и в фенольном методе, гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 15 мл раствора А: 0,15 М NaCl+0,015 М цитрата натрия+0,01 М ЭДТА (рН 8,2), добавляли ДДС до 2%, инкубировали 10—15 мин при 60°, добавляли NaCl до 1 М и центрифугировали 20 мин при 16000 G. ДДС высаждали добавлением ацетата калия до 1 М и удаляли центрифугированием (20 мин при 16000 G).

Концентрацию NaCl доводили в растворе до 0,5 М разбавлением, добавляя одновременно 20%-ный раствор цетавлона до концентрации 1%. Осадок цетавлоновой соли ДНК наматывали на палочку, промывали два раза 0,1%-ным цетавлоном+5 М мочевиной+0,5 М NaCl, дважды по 10 мин в 1 М ацетате натрия+70%-ный этанол и дважды — в 70%-ном этаноле. ДНК растворяли в 0,15 М NaCl. Раствор, из которого высаждали ДНК, разбавляли до концентрации NaCl 0,4 М, затем 0,3 М (при 1% концентрации цетавлона). Образовавшиеся осадки отделяли и промывали как сказано выше. Растворенную ДНК переосаждали таким же образом еще раз и снова растворяли;

в) детергентный метод (Кау и др., 1952). 5 г зародышей растирали, как в первом методе, гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 45 мл раствора А, фильтровали через 6 слоев марли и центрифугировали при 1500 G 15 мин. Супернатант выливали, осадок трижды промывали 30 мл раствора А и осаждали в тех же условиях.

Осадок суспендировали в 10 мл 2%-ном ДДС в растворе А, встряхивали в течение нескольких минут и выдерживали 20 мин при 60°. Добавляли NaCl до 1 М, встряхивали 10 мин и центрифугировали 20 мин

при 2500 G. ДНК осаждали из супернатанта этанолом и растворяли в 3 мл 0,015 M NaCl. К раствору ДНК добавляли ДДС до 2% и встряхивали 45 мин, затем, после добавления NaCl до 1 M концентрации, встряхивали смесь еще несколько минут и центрифугировали при 20 000 G 45 мин. ДНК осаждали из супернатанта изопропанолом, растворяли, доводили концентрацию NaCl до 2 M, выдерживали ночь при +4°, центрифугировали в течение 1 ч при 26000 G, осаждали ДНК из супернатанта этанолом и растворяли.

В случае необходимости проводили обработку РНКазой, как описано в первом методе.

**Гидролиз ДНК.** Для кислотной апуринизации ДНК к раствору ДНК добавляли равный объем 0,2 N HCl, выдерживали 30 мин при 70° и нейтрализовали.

### Результаты и обсуждение

Принципиальным этапом исследований, связанных с использованием радиоактивного модифицирующего агента, от которого полностью зависит обоснованность выводов работы, является этап выделения модифицированной ДНК. Выделение должно быть, во-первых, по-возможности количественным и, во-вторых, должно приводить к максимально чистому продукту, чтобы можно было с уверенностью полагать, что метка действительно связана с ДНК.

Мы начали поэтому с воспроизведения методов выделения ДНК из растений, описанных в литературе, несколько модифицируя их.

Использован метод (Кораблева, Ладыженская, 1975) экстракции ДНК из меристематической ткани лука растворами додецилсульфата натрия в 0,1 M NaCl+0,1 M ЭДТА с последующей депротеинизацией фенолом. При воспроизведении этого метода мы нашли, что с его помощью выделяется ДНК, имеющая хорошие спектральные характеристики. ( $D_{260}/D_{230}=2,28$ ,  $D_{260}/D_{280}=2,1$ ,  $D_{260}/D_{250}=1,1$ ) и содержащая мало (менее 2%) белка. Для очистки препарата от РНК необходима обработка РНКазой. Выход ДНК 1 мг на 6,5 г зародышей (среднее по трем выделениям).

Мы пытались применять для отделения ДНК от РНК цетавлоновый метод (Сулимова и др., 1976; Нактинис и др., 1977), который основан на способности цетилтриметиламмоний бромид (цетавлона) образовывать с нуклеиновыми кислотами нерастворимые в воде комплексы. В солевых растворах, если концентрация соли выше некоторого критического значения, эти комплексы растворимы. Так как, по литературным данным, для ДНК эта критическая концентрация 0,5 M NaCl, а для РНК 0,4 M NaCl, то можно было ожидать, что удастся разделить ДНК и РНК в растворе (Нактинис и др., 1977).

В нашем случае при ступенчатом уменьшении концентрации NaCl в среде от 0,5 до 0,3 M осаждались одновременно комплексы цетавлона с РНК и с ДНК. При этом в среде с концентрацией NaCl 0,5 M высаждалось в среднем 30—50% всей ДНК с примесью 20—30% всей РНК, а при концентрации NaCl 0,4 M 50—70% всей ДНК и 70—80% всей РНК. Суммарный выход неочищенной от РНК ДНК 1 мг на 3 г зародышей (среднее по пяти выделениям). Смесь ДНК и РНК не удалось разделить и гельфилтрацией на сефадексе G-200 / элюент: 1 M NaCl, 0,1 M трис-HCl, pH 7,2 (Bartoli, Rossi, 1967).

Наилучшие результаты были получены при выделении ДНК по несколько модифицированному детергентному методу Кэя (Кэу и др., 1952). Спектрофотометрические параметры выделенной ДНК не отличались от параметров ДНК, полученной фенольным методом. Содержание белка в препарате ниже чувствительности метода Лоури, гиперхромизм

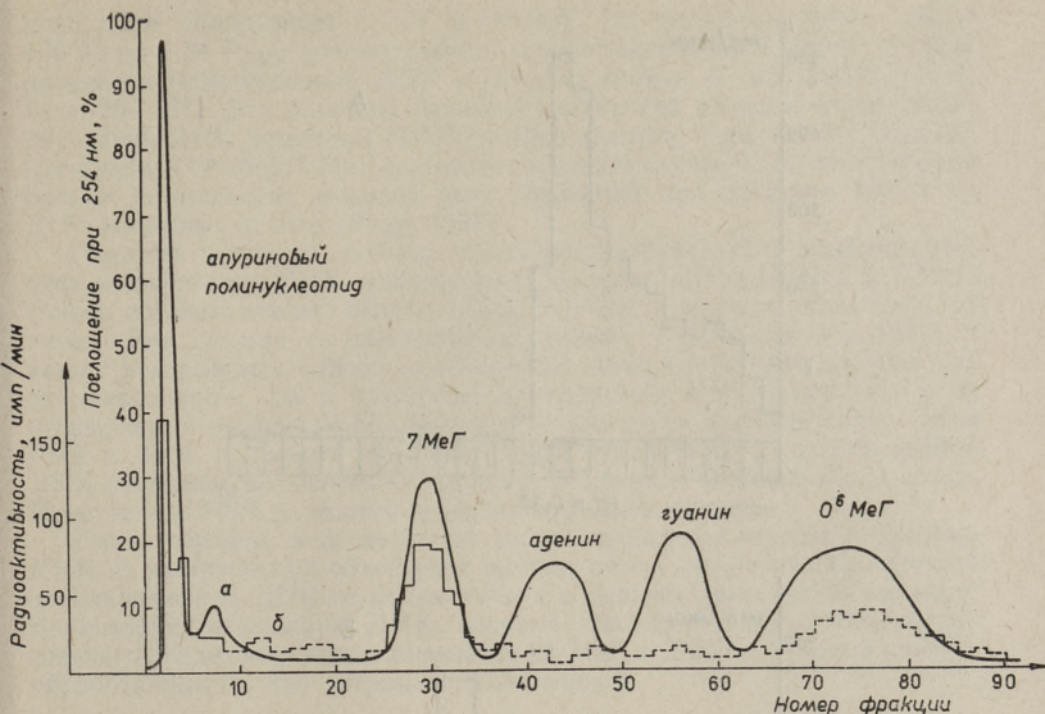


Рис. 1. Профиль элюции гидролизата метилированной ДНК (3 мМ НММ, рН 7, 24 ч) с колонки с сефадексом G-10. Элюция водой (100 мл/ч). Объем каждой фракции 13,5 мл, радиоактивность приведена в расчете на 1 мл. а — поглощение при 254 нм, б — радиоактивность.

35—38%, РНК не более 4—6% (в отдельных случаях ниже 2%). Обработка РНКазой снижала содержание РНК до 1—2%. Выход ДНК около 1 мг из 5 г зародышей.

Способ выделения ДНК по Кэю мы решили положить в основу методики измерения степени модификации ДНК  $^{14}\text{CH}_3\text{-НММ}$ . Было установлено, что этот метод выделения модифицированной ДНК достаточно удобен и позволяет анализировать степень модификации ДНК даже при небольшой дозе воздействия и при малых количествах изучаемого материала.

Была измерена степень метилирования ДНК в зародышах семян, обработанных 3 мМ НММ при рН 7 и 20—22° в течение 24 ч. При этой концентрации НММ в нейтральной среде токсический эффект на стадии прорастания невелик — всхожесть семян сорта «Мийна» составляет 94% всхожести контрольных. Степень метилирования ДНК оказалась равной  $1330 \pm 100$  метильных групп на  $10^6$  нуклеотидов (по данным четырех выделений). Известно, что при переходе из нейтральной забуференной среды в слабокислую возрастают как мутагенный эффект, так и токсичность НММ (Орав и др., 1976). В среде с рН 5 обработка семян 3 мМ концентрацией НММ (24 часа, 20—22°) снижает всхожесть семян до нуля, а степень метилирования ДНК увеличивается почти вдвое — 2850 метильных групп на  $10^6$  нуклеотидов.

Направление метилирования ДНК НММ в семенах ячменя было исследовано следующим образом. Модифицированную ДНК гидролизовали 0,1 N HCl в течение 30 мин при 70° (Lawley, Thatcher, 1970). Гидролиз в этих условиях приводит к высвобождению из ДНК аденина, гуанина и всех метилированных пуриновых оснований. К продуктам гидролиза добавляли свидетели —  $\text{O}^6\text{-метилгуанин}$  ( $\text{O}^6\text{-MeГ}$ ) и 7-метилгуанин

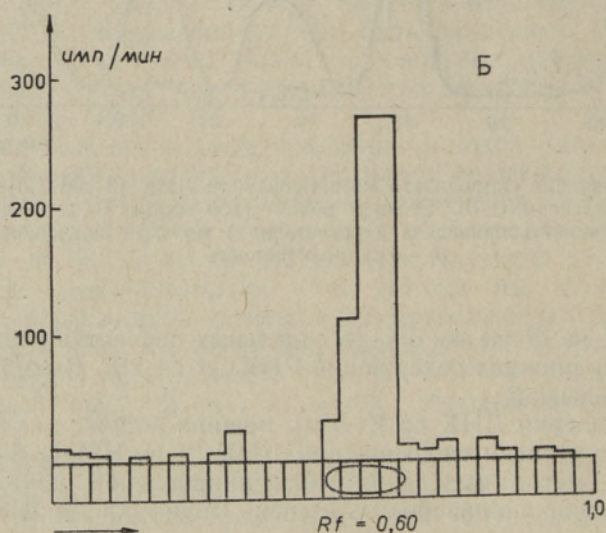
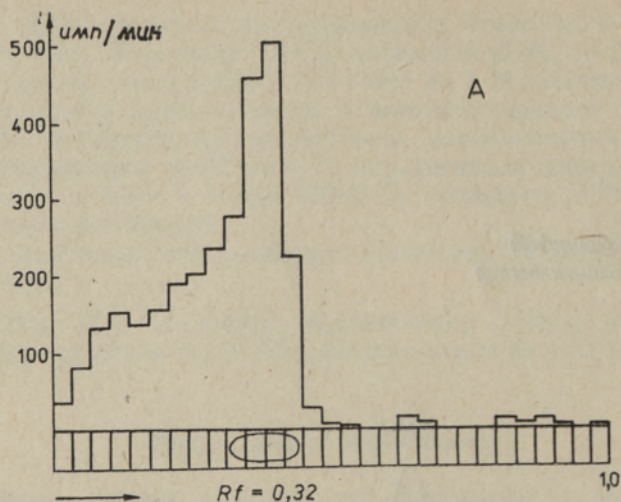


Рис. 2. А — хроматография фракции 7-МеГ с сефадекса G-10 (рис. 1) на бумаге в системе н-пропанол—концентрированный раствор аммиака—вода. Б — то же для фракции  $O^6$ -МеГ.

(7-МеГ) и разделяли продукты гидролиза гельфильтрацией на сефадексе G-10 (рис. 1). Собирали фракции свидетелей и измеряли радиоактивность, обусловленную присутствием в них радиоактивных продуктов гидролиза метилированной ДНК —  $O^6$ - $^{14}CH_3$ - и  $7$ - $^{14}CH_3$ -гуанинов. Гомогенность полученных фракций меченых свидетелей проверяли с помощью бумажной хроматографии в двух системах. В обоих случаях  $O^6$ -МеГ давал четкое пятно, и на бумаге не было других радиоактивных пятен. Пятно 7-МеГ в обеих системах имело небольшой «хвост» радиоактивных веществ (рис. 2), что обычно наблюдается при хроматографии 7-МеГ. УФ-спектры (в нейтральной, кислой и щелочной среде) свидетелей, элюированных с бумаги после всех последовательных хроматографий, не отличались от их начальных спектров, что доказывает стабильность этих соединений в процессе анализа.

Основные результаты анализа следующие. Среди продуктов гидро-

лиза ДНК обнаружены 7-МеГ и О<sup>6</sup>-МеГ. Их выход составляет 870 и 130 М на 1 М Р<sub>ДНК</sub> соответственно, что составляет 75% общего выхода продуктов метилирования ДНК в семенах ячменя (3 мМ НММ, рН 7, 24 ч, 20—22°). Эта величина близка к полученной ранее, в случае метилирования ДНК животных НММ in vitro (Lawley и др., 1973). Отношение выходов О<sup>6</sup>-МеГ/7-МеГ составляет в нашем случае 0,15, что несколько больше соотношения выходов этих оснований при действии НММ на ДНК животных in vivo (Pegg, 1977).

Отметим, что в тех случаях, когда нет необходимости измерять степень модификации ДНК, а желательнее измерить выход О<sup>6</sup>-МеГ и 7-МеГ, можно опустить стадию очистки ДНК от РНК и гидролизовать сразу их смесь. Как следует из литературных данных (Lamola и др., 1967) и наших контрольных опытов, в описанных выше условиях гидролиза как метилированные, так и канонические основания РНК стабильны и не отщепляются от цепи РНК. Поэтому можно гидролизовать сразу смеси РНК и ДНК, проводить гельфильтрацию, а количество гидролизованной ДНК рассчитать по количеству гуанина и аденина, сошедших с колонки. Присутствие РНК не мешает проведению гельфильтрации.

Таким образом, в проведенной работе проверены методы выделения ДНК из растительных объектов и выбран метод, позволяющий получить метилированную ДНК из семян ячменя с удовлетворительным выходом. Анализируя выделенную ДНК, впервые удалось показать образование главного предмутационного изменения О<sup>6</sup>-МеГ в ДНК зародышей ячменя, обработанных in vivo нитрозометилмочевинной.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Ардт Ф. Нитрозометилмочевина. — В сб.: Синтез органических препаратов. М., 1949, 373.
- Кораблева Н. П., Ладыженская Э. П. Выделение ДНК из растительных тканей. — В кн.: Методы современной биохимии. М., 1975, 34—37.
- Нактинис В. И., Малеева Н. Е., Саныко Д. Ф., Мирзабеков А. Д. Два простых метода выделения ДНК из растительных источников с применением цетавлона. — Биохим., 1977, 42, 83—88.
- Орав И., Зоз Н., Орав Т., Серебряный А., Рандалу К. Частота хлорофильных мутаций в ячменя после обработки химическими мутагенами при разных рН. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1976, 25, 249—251.
- Сулимова Г. Е., Дрожженюк А. П., Ванюшин Б. Ф. Выделение и очистка ДНК из высших растений с помощью бромистого цетилтриметиламмония в сочетании с хроматографией на оксиапатите. — Биоорг. химия, 1976, 2, 1182—1187.
- Bartoli, F., Rossi, J. Separation of DNA and RNA by gel filtration. — J. of Chromatogr., 1967, 28, 30—33.
- Bray, G. A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. — Biochemistry, 1960, 2, 279—282.
- Friedmann, O. M., Mahapatra, G. N., Dash, B., Stevenson, R. Studies on the action of diazomethane on deoxyribonucleosides. — BBA, 1965, 103, 286—294.
- Kay, E. R. M., Simmons, N. S., Dounce, A. L. An improved preparation of sodium deoxyribonucleate. — J. Amer. Chem. Soc., 1952, 74, 1724—1727.
- Kobayashi, Y., Maudsley, D. V. Biological Application of Liquid Scintillation Counting. N. Y., 1974.
- Lamola, A. A., Gneron, M., Yamane, T., Eisinger, J., Schulman, R. G. Triplet state of DNA. — J. Chem. Phys., 1967, 47, 2210—2217.
- Lawley, P. D., Thatcher, C. J. — Methylation of deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. — Biochem. J., 1970, 116, 693—699.
- Lawley, P. D., Orr, D. J., Shah, S. A., Farmer, P. D., Jarman, M. Reaction products from N-methyl-N-nitrosourea and deoxyribonucleic acid containing thymidine residues. Synthesis and identification of new methylation product, O<sup>4</sup>-methylthymidine. — Biochem. J., 1973, 135, 193—201.
- Lewy, S., Simpson, R. T., Sober, H. A. Fractionation of chromatine compounds. — Biochemistry, 1972, 11, 1547—1552.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. — J. Biol. Chem., 1951, 193, 265—269.

- Pegg, A. E. Formation and metabolism of alkylated nucleosides: possible role in carcinogenesis by nitroso compounds and alkylating agents. — J. Nat. Cancer Inst., 1977, 58, 681—685.
- Singer, B. N-Nitroso alkylating agents: formation and persistence of alkyl derivatives in mammalian nucleic acid as contributing factors in carcinogenesis. — J. Nat. Cancer Inst., 1979, 62, 1324—1331.
- Veleminsky, J., Pokorny, V., Svaluchova, J., Gichner, T. The alkylation of cell macromolecules in barley embryos with mutagenic N-methyl-(<sup>14</sup>C)-N-nitroso-urea. — Biologia Plantarum (Praha), 1972, 14, 234—237.

Институт экспериментальной биологии  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
3/VI 1983

Kadri JARVE, Jelena TSÖMBALOVA, Aleksandr SEREBRIANŌI

#### PÖHILISED REAKTSIOONIPRODUKTID ODRA DNA METÜÜLIMISEL NITROSOMETÜÜLKARBAMIIDIGA

Artiklis on käsitletud mutageeni N-nitroso-N-metüülkarbamiid toimet odra 'Miina' seemnetele. Erinevate meetodite võrdlemisel on leitud, et DNA eraldamiseks odraidudest on sobivaim detergentmeetod. On määratud DNA metüülimisaste odraidudes pärast seemnete töötlemist mutageenidega. Modifitseeritud DNA-st on eraldatud kaks metüülitud lämmastikalust — 7-metüülguaniin ja O<sup>6</sup>-metüülguaniin ning on määratud nende saagis kõnesolevate töötlemistingimuste korral.

Kadri JARVE, Yelena TSYMBALOVA, Aleksandr SEREBRYANYI

#### GENERAL PRODUCTS OF BARLEY DNA METHYLATION BY N-METHYL-N-NITROSOUREA

Three procedures for isolating DNA from plant tissues were compared; the use of the detergent procedure proved to be the most effective one for isolating DNA from barley embryos. The amount of barley embryo DNA methylation after the treatment of seeds with mutagen N-methyl-N-nitroso-urea and the amount of the main alkylation product — 7-methylguanine and that of the general pre-mutagenic alkylation product — O<sup>6</sup>-methylguanine — were determined.