

КРАТКИЕ НАУЧНЫЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 557.1:578.087.9.

В. Т. ГАЛФАЯН, Р. С. БАБЛОЯН, Р. А. ЗАХАРЯН

ХРОМАТОГРАФИЯ 5-МЕТИЛЦИТОЗИНА НА КОЛОНКЕ
ДАУЭКС 50 Н⁺

Метилированные производные пуриновых и пиримидиновых оснований являются характерными компонентами ДНК.

В ДНК всех животных в качестве минорного основания содержится 5-метилцитозин [5]. Имеются сведения о наличии в ДНК животных клеток и других метилированных оснований: 6-метил-аденина, 1-метил-гуанина, 7-метил-гуанина, диметилгуанина и др. [3, 4]. 6-метиладенин характерен для ДНК ряда микроорганизмов [2].

Минорные основания в ДНК представлены в незначительном количестве, и их обнаружение, идентификация и количественная оценка связаны с определенными методическими трудностями. Обычно основания разделяют методом хроматографии на бумаге с помощью двукратной одномерной или двумерной хроматографии с последующей рехроматографией минорных оснований. Такая рехроматография может приводить к частичной потере метилированных оснований; поэтому во избежание потерь, не прибегая к рехроматографии, иногда вводят поправку ΔE при опектрометрической количественной оценке минорного компонента в соответствующих элюатах, где в заметных количествах обнаруживаются и другие основания [1].

Для количественного разделения одного из минорных оснований—5-метилцитозина—из кислотного (72% HClO_4) гидролизата ДНК животных нами была испытана с положительным результатом хроматография оснований ДНК на колонке Дауэкс 50 Н⁺, что и является предметом настоящего сообщения.

Материал и методика. Дауэкс—50—w X 12 (Н⁺) 200—400 меш. после декантации вливали в колонку 1×23 см, уравнивали 0,25 М HCl .

Кислотный гидролизат ДНК (0,25—1,5 мг) мозга крыс и эритроцитов цыпленка наносили на колонку в 0,2 М HCl , элюцию оснований проводили в линейном градиенте HCl 1 М—4 М. Скорость элюции—9 мл/час, сбор элюата по фракциям в 3 мл. Профиль элюции оснований ДНК записывали на проточном УФ денситометре марки «CSAV». После разделения основания и 5-метилцитозин спектрофотометрировали на спектрофотометре «Uniscan Sp—800».

Типичный профиль разделения оснований из кислотного гидролизата ДНК приведен на рисунке. Тимин [1] в используемых условиях элюирования слабо удерживается на катионите, цитозин элюируется в

пике II, а 5-метилцитозин—за цитозином. Гуанин и аденин благодаря большой емкости положительного заряда в данной системе элюируются значительно позже—в IV и V пике соответственно.

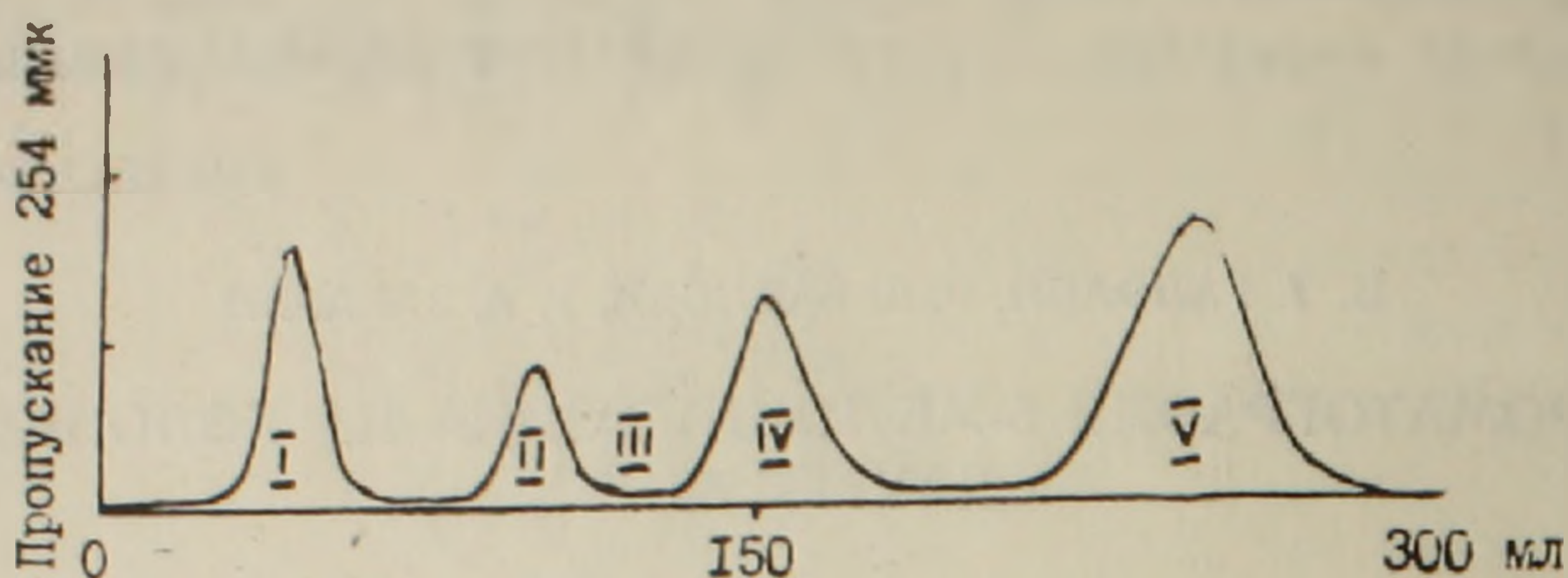


Рис. Хроматографическое разделение кислотного гидролизата ДНК.
Колонка 1×23 см Дауэкс—50—10×12 (H⁺).

5-метилцитозин не регистрируется денситометром при 254 мкм, его идентифицируют спектрофотометрически с характерным максимумом

поглощения при 283 мкм. pH 2, $E \frac{250}{260} = 0,41$; $E \frac{280}{260} = 2,66$.

Содержание оснований в мол.% в ДНК мозга крыс и эритроцитов цыпленка по данным хроматографического разделения на Дауэксе 50w×12 (H⁺) соответственно следующее:

гуанин—21,5; цитозин—19,9; 5 МЦ—0,98±0,02;
аденин—28,8; тимин—28,8; гуанин—20,7; цитозин—20,0;
5 МЦ—0,9±0,03; аденин—29,3; тимин—29,2 соответственно.

В данной системе хроматографического разделения удастся получить количественное разделение 5-метилцитозина от гуанина и цитозина.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 29.XII 1973 г.

Վ. Թ. ԳԱԼՖԱՅԱՆ, Բ. Ս. ԲԱԲԼՅԱՆ, Բ. Ա. ԶԱԽԱՐՅԱՆ

5-ՄԵԹԻԼՑԻՏՈՋԻՆԻ ՔՐՈՄԱՏՈԳՐԱՖԻԱՆ ՍՅՈՒՆԱՅԻՆ ԵՂԱՆԱԿՈՎ՝
ԴԱՌԻԵԿՍ 50H⁺

Ա. մ. փ. ո. փ. ո. լ. մ.

Կենդանական ԴՆԹ-ի թթվային հիդրոլիզատից 5-մեթիլցիտոզինի բաժանումը փորձվել է սյունային 50w×12 (H⁺) բրոմատոգրաֆիայի միջոցով։ Պուրինային և պիրիմիդինային հիմքերի էլուիացիան գծային-գրադիենտով HClI մոլ.—4մոլ. հնարավորություն է ընձեռում ստանալու 5-մեթիլցիտոզինի բանական բաժանումը։

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Васильев В. К., Гарибян Д. В., Захарян Р. А., Галоян А. А., Ванюшин Б. Ф. ДАН СССР, 205, 3, 721, 1972.
2. Пахомова М. В., Зайцева Г. Н., Белозерский А. Н. ДАН СССР, 182, 712, 1968.
3. Culp L. A., Dore E., Brown G. M. Arch. Biochem. Biophys., 136, 73, 1970.
4. Harbers E., Alam S. N., Hoppe-Seylers Z. Physiol. chem., 349, 1246, 1968.