

М. П. ЗНАМЕНСКАЯ, Н. С. ДЕМЯНОВСКАЯ и А. Н. БЕЛОЗЕРСКИЙ

О НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВАХ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ОБЪЕКТОВ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

(Представлено академиком А. И. Опариным 7 IX 1953)

На основании наших наблюдений над изменением количества дезоксирибонуклеиновой кислоты в развивающемся мицелии актиномицета (*Actinomyces globisporus*) и связи этого изменения с окислительно-восстановительным состоянием организма у нас возникла мысль, не является ли содержание дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в мицелии в какой-то мере обусловленным различной интенсивностью окислительно-восстановительных процессов на всем протяжении его жизненного цикла.

В связи с этим мы хотели в модельных опытах выяснить, как отражается окисление и восстановление мицелия актиномицета на последующем определении в нем содержания ДНК. В качестве окислителя мы брали раствор железосинеродистого калия в концентрации $M/4$ или раствор перекиси водорода в концентрации $0,05-0,06 N$; в качестве восстановителя мы пользовались 2% $HgNa$. Опыты по окислению мицелия мы проводили следующим образом: воздушно-сухие препараты мицелия разных стадий развития с различным содержанием в них ДНК мы оставляли стоять при комнатной температуре в течение нескольких (2—3) суток с раствором железосинеродистого калия или с раствором перекиси водорода, после чего мицелий отделялся от окислителя, тщательно отмывался от его следов и высушиванием спиртом и эфиром доводился до воздушно-сухого состояния. Восстановление мицелия мы проводили путем прибавления к взвеси мицелия в воде небольших кусочков $HgNa$ на протяжении 2—3 суток, причем путем добавления разбавленного раствора HCl pH реакционной смеси поддерживалось в пределах $6,5-7,5$. Взвешенный мицелий отделялся затем от раствора и ртути (на дне), тщательно промывался водой, спиртом и эфиром и доводился до воздушно-сухого состояния. Определение содержания ДНК в препаратах мицелия как до, так и после окисления или восстановления его мы проводили по общепринятому методу Дише (^{1,2}) и в некоторых случаях еще и по более чувствительному методу Черриотти (³). В качестве стандарта мы во всех случаях пользовались калибровочной кривой, полученной на препарате ДНК из зубной железы с известным содержанием в нем фосфора. Колориметрирование производилось нами в ступенчатом фотометре Пульфриха при длине волны в случае определения ДНК по методу Дише в $610 m\mu$ и по методу Черриотти $500 m\mu$.

Данные анализированных различных препаратов мицелия на содержание в них ДНК приведены в табл. 1 и 2 в процентах на абсолютно-сухой и беззольный препарат. Контрольные пробы на чистоту реактивов, проделанные со следами ионов ртути и металлической ртути, а также с незначительным количеством ионов $Fe(CN)_6^{4-}$ и $Fe(CN)_6^{3-}$, не дали следов синего окрашивания.

Содержание ДНК в препаратах мицелия актиномицета, подвергнутого окислению

№№ препара- тов	ДНК в препаратах мицелия разного возраста до окис- ления. Метод Дише	ДНК в тех же препаратах мицелия после их окисления			
		$K_3Fe(CN)_6$		H_2O_2	
		метод Дише	метод Чериотти	метод Дише	метод Чериотти
1	0,00	0,00	0,00	—	—
2	1,81	0,00	0,00	—	—
3	3,65	Слаб. зелен. окраш.; не колориметри- ровалось	Не опр.	—	—
4	4,55	То же	1,36	—	—
5	2,61	Зеленоват. окраш.; не колориметри- ровалось	Не опр.	Слаб. зелен. окраш.; не колориметри- ровалось	0,68
6	3,69	То же	.	То же	—

Препараты 5 и 6, как видно из табл. 1, окислялись, помимо $K_3Fe(CN)_6$, и перекисью водорода при разном значении pH: 5; 7; 8,2; в случае окисления при pH 8,2 препараты не давали никакого, даже слабого зеленоватого, окрашивания.

Из табл. 1 видно, что препараты мицелия 1 и 2 с первоначальным содержанием в них ДНК 0,00 и 1,81% в результате окисления не обнару-

Таблица 2

Содержание ДНК в препара-
тах мицелия актиномицета
после воздействия на них
амальгамы натрия

№№ препа- ратов	ДНК в препа- ратах мицелия разного возра- ста до восста- новления. Ме- тод Дише	ДНК в тех же препа- ратах мицелия после их восстановления	
		метод Дише	метод Чериотти
1	0,00	0,25	0,25; 0,30*
2	1,93	3,65	3,39; 3,75*

* Результаты параллельных опреде-
лений с разными навесками препарата.

(HgNa) ведет или к появлению в мицелии реакции на ДНК в слабой степени (в случае препарата 1) или к значительному увеличению количества ДНК (в случае препарата 2, где первоначальное содержание ее было равно 1,93%). Интересно, что в последнем случае определение рибонуклеиновой кислоты (РНК) в этом препарате мицелия, подвергнутом восстановлению, дало величину 5,58% при первоначальной (до восстановления), равной 6,97%.

Аналогичные наблюдения по действию окислителей, естественно, было интересно провести на содержащих ДНК препаратах из других объектов растительного или животного происхождения и в первую очередь на препаратах ДНК из зубной железы, служившей нам стандартом при колориметрировании.

Исследования показали, что окисление препарата ДНК из зубной железы с помощью $K_3Fe(CN)_6$ или H_2O_2 в вышеописанных условиях не снижает интенсивности цветной реакции при последующем определении содержания ДНК по методу Дише в окисленном препарате. Окисление с помощью $K_3Fe(CN)_6$ свежего препарата зубной железы в вышеописанных условиях равным образом не отразилось на определении в нем содержания ДНК.

Окисление же с помощью раствора $K_3Fe(CN)_6$ препарата ДНК из зародышей пшеницы и сухой массы дизентерийных бактерий привело к значительному понижению процента ДНК в препаратах в результате их окисления. Полученные нами данные представлены в табл. 3.

Замеченный нами факт исчезновения реакции Дише и Чериотти на ДНК в мицелии актиномицета после воздействия на него окислителей свидетельствует, повидимому, о нестойкости углеводной части ДНК мицелия по отношению к окислителям, поскольку цветные реакции Дише и Чериотти характерны прежде всего для углеводной части ДНК. Какова природа получающегося продукта окисления углеводной части ДНК. Какова природа получающегося продукта окисления углеводной части ДНК мицелия и каков механизм этой реакции, мы еще не знаем, как не знаем и того, затрагиваются ли как-либо пуриновые и пиримидиновые основания нуклеиновых кислот мицелия в процессе проводимого нами его окисления. Наши исследования показали, что это окисление ДНК необратимо, так как последующее восстановление посредством амальгамы натрия препаратов мицелия, ранее окисленных с помощью $K_3Fe(CN)_6$, не приводило к появлению в них реакции Дише на ДНК. Задачей наших дальнейших исследований является выяснение характера изменений, происходящих с ДНК мицелия во время окисления.

Появление или усиление реакции Дише на ДНК в мицелии после его восстановления говорит о возможности существования в мицелии предшественников ДНК, превращающихся в результате восстановления в качественно новую форму, которая может быть затем учтена обычными методами определения ДНК. Конечно, мы не имеем пока исчерпывающих данных, говорящих о том, что нарастание содержания ДНК в мицелии происходит за счет уменьшения содержания РНК в нем, т. е. что эти два процесса неразрывно связаны друг с другом. Но, с другой стороны, видимо, не случайным является, как это уже отмечалось выше, факт снижения содержания РНК в мицелии после его восстановления с одновременным увеличением содержания в нем ДНК.

Проведенные нами модельные опыты по окислению и восстановлению мицелия актиномицета в известной мере подтверждают высказанное нами ранее предположение о существовании определенной связи между содержанием ДНК в мицелии и интенсивностью окислительно-восстановительных процессов, происходящих в нем на разных стадиях его развития, и дают некоторое основание говорить о синтезе и распаде *in vivo* ДНК, как и всякого другого вещества, необходимого клетке.

На основании проведенных нами исследований мы вправе думать

Таблица 3

Препарат	ДНК в препаратах до окисления	ДНК в тех же препаратах после окисления их $K_3Fe(CN)_6$ в течение 3 суток
ДНК из зародышей пшеницы (возд.-сух. препарат)	60	21
Возд.-сух. препарат бактериальной массы (дизентер. бактерии)	3,75	0,9

* Выражаем признательность С. И. Урысон за представление нам препарата ДНК из пшеничных зародышей.

также, что ДНК из разных источников (мицелий актиномицета, дизентерийные бактерии, зубная железа кролика, пшеничные зародыши) и в первую очередь ее углеводная часть относятся не одинаково стойко к окислителям, результатом чего и является значительное уменьшение интенсивности реакции на ДНК в случае пшеничных зародышей и в еще большей степени в случае бактериальной массы или даже полное отсутствие реакции Дише в случае мицелия актиномицета.

Неодинаковая стойкость ДНК из разных источников в отношении действия окислителей свидетельствует о различии ДНК в разных объектах, что, несомненно, связано со структурными ее особенностями и позволяет говорить не об единой ДНК, а о различных отличающихся друг от друга дезоксирибонуклеиновых кислотах.

Можно было бы думать, что различное поведение ДНК из разных источников зависит не только от ее структурных особенностей, но и от всей специфики связанных с нею веществ, характерных для клеточного содержимого данного организма. Однако вряд ли было бы правильно встать всецело на эту точку зрения, так как определение ДНК непосредственно в зубной железе показало нам, что она определяется в том же количестве и после предварительного окисления зубной железы.

Возможно, что большая лабильность углеводной части ДНК в мицелии актиномицета, значительная также лабильность ДНК в бактериях, меньшая лабильность в случае пшеничных зародышей и большая стабильность ДНК из зубной железы отражают в какой-то мере физиологическое своеобразие того объекта или той ткани, в которых она находится. В самом деле, наиболее сильное воздействие окислители оказывают на ДНК в клетках микроорганизмов и зародышевых тканей. ДНК из специализированной ткани оказывается достаточно устойчивой к воздействию окислителей.

В связи с полученными нами данными интересно заметить, что за последнее время накоплен достаточно большой материал о «неодинаковости» дезоксирибонуклеиновых кислот из разных источников (⁴). Авторы исследований отмечали различие дезоксирибонуклеиновых кислот по соотношению пуриновых и пиримидиновых оснований.

Поступило
7 III 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Z. Dische, *Mikrochemie*, 8, 4 (1930). ² А. Н. Белозерский, Н. И. Прокуряков, *Практическое руководство по биохимии растений*, 1951, стр. 219.
³ G. Ceriotti, *J. Biol. Chem.*, 198, No. 1, 297 (1952). ⁴ E. Chargaff, *Symposium sur le métabolisme microbien*, Paris, 1952.