

А. В. ЛИХТЕНШТЕЙН

### ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ЯДЕРНЫХ И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ НА КОЛОНКЕ МЕТИЛИРОВАННОГО АЛЬБУМИНА — КИЗЕЛЬГУРА

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 20 X 1969)

Ранее нами было показано (<sup>1-3</sup>), что модификация процедуры элюции РНК с колонки МАК с использованием солевого и температурного градиента позволяет значительно увеличить разрешающую способность метода. До работы Эллама и Шеридана (<sup>4</sup>), показавших существование особо

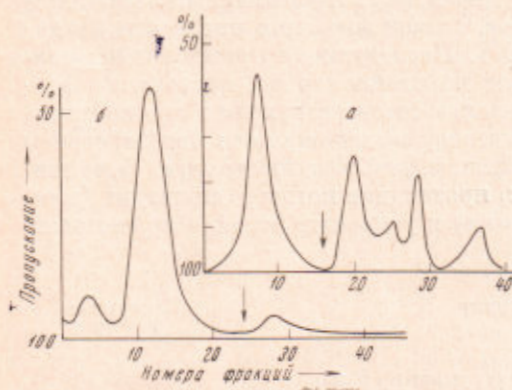


Рис. 1. Фракционирование РНК на колонке МАК с использованием солевого и температурного градиента. Сорбция в 0,6 M NaCl 0,01 M триэтанолламин-НСI (рН 6,7; 20°). Солевой градиент 0,6—1,5 M NaCl, 37°. Температурный градиент 37—98°; 1,5 M NaCl. Стрелка — начало температурного градиента. Скорость течения 60 мл/час. Регистрация оптической плотности автоматически на «Unicord» (LKB).  $\lambda$  253,7 мк, длина светового пути 0,5 см. а — Я-РНК, б — Ц-РНК

прочной связанной с колонкой фракции РНК («температурная» фракция — Т-фракция), она ускользала из поля зрения исследователей. На рис. 1а показано типичное разделение ядерной РНК (Я-РНК).

Известно (<sup>5-8</sup>), что Я-РНК можно подразделить на две группы: 1) переходящие затем в цитоплазму (мРНК, рРНК, сРНК) и участвующие там в синтезе белка и 2) остающиеся в ядре, быстро распадающиеся РНК, выполняющие пока неизвестные нам функции.

Представляло интерес сопоставление хроматографических профилей ядерных и цитоплазматических РНК (Ц-РНК). Я-РНК получали методом Георгиева и Мантgieвой в интервале температур 20—65°, Ц-РНК выделяли посредством фенольной депротенинизации цитоплазматического экстракта и пересаждали 2,5 M NaCl для освобождения от сРНК.

Профиль Ц-РНК приведен на рис. 1б. Различие между кривыми весьма значительно и сводится к почти полному отсутствию в Ц-РНК Т-фракции. Определяемая же незначительная оптическая плотность представляет собой рРНК, в небольшом количестве (3—4%) попадающую в область Т-фракции. Это показала рехроматография этого пика и «солевой» фракции, а также нуклеотидный состав этого пика. Рехроматография же и нуклеотидный состав ядерной Т-фракции свидетельствуют о том, что это РНК, отличные от рибосомной. Следовательно, 28S- и 18S-рРНК и цитоплазматическая мРНК выходят при фракционировании на колонке МАК одним пиком.

Известно (<sup>9</sup>), что разделение на МАК происходит по молекулярному весу и нуклеотидному составу (по мере увеличения молекулярного веса РНК или содержания в ней аденина и урацила прочность сорбции увеличивается). Сорбция происходит за счет ионных связей между фосфатными группами полинуклеотида и аминокгруппами альбумина. Естественно пред-

положить, что прочность связывания определяется количеством ионных связей, приходящихся на данную молекулу РНК. Эта величина (количество связей) должна, очевидно, находиться в прямой зависимости от числа фосфатных групп в молекуле, т. е. от ее молекулярного веса. Вместе с тем, важное значение должна иметь конформация РНК. При конформации в виде компактного клубка большое число фосфатных групп «спрятано» внутри него, и лишь ограниченное количество их способно связываться с колонкой. Именно в этом, по нашему мнению, заключается влияние нуклеотидного состава на прочность сорбции. РНК АУ-типа, скорее, подвержена влиянию различных денатурирующих агентов и образует менее

Таблица 1

Отношение Т-фракция. С-фракция при различных условиях посадки Ц-РНК на колонку МАК

Условия посадки РНК на колонку	Условия элюции		Т/С
	С-фракция	Т-фракция	
0,6 М NaCl, 20° (стандартные условия)	1,5 М NaCl, 37°	1,5 М NaCl, 98°	0,03
0,1 М NaCl, 20°	1,5 М NaCl, 37°	То же	0,15
0,1 М KCl, 20°	1,5 М KCl, 37°	1,5 М KCl, 98°	1,3
0,1 М NaClO <sub>4</sub> , 20°	1,0 М NaClO <sub>4</sub> , 37°	1,0 М NaClO <sub>4</sub> , 98°	16,1
0,6 М NaCl, 8 М мочевины, 40°	1,5 М NaCl, 37°	1,5 М NaCl, 98°	17,2
0,6 М NaCl, 70°	1,5 М NaCl, 37°	То же	23,1

компактные клубки при прочих равных условиях, чем РНК ГЦ-типа. Если это предположение верно, то денатурирующие агенты должны увеличивать прочность сорбции РНК на колонке за счет увеличения реагирующей поверхности. Действительно, «посадка» РНК на колонку в условиях, способствующих денатурации (воздействие мочевины, низкой ионной силы, повышенной температуры, присутствие аниона ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>), вызывает миграцию Ц-РНК из «солевой» (С-фракции) в Т-фракцию, что свидетельствует о возросшей прочности связывания (табл. 1).

Интересно, что замена Na<sup>+</sup> на K<sup>+</sup> при низких ионных силах значительно усиливает переход РНК в Т-фракцию, что, очевидно, объясняется меньшей экранирующей способностью K<sup>+</sup>, связанной с его большим кристаллохимическим радиусом. Из всего сказанного следует, что хроматографическое положение данной фракции РНК не «абсолютно», а определяется конкретными условиями ее сорбции на колонке. Можно ожидать, что использование денатурирующих агентов в методе фракционирования на колонке МАК должно повысить разрешающую способность метода, так как в этих условиях должны более отчетливо проявляться различия в молекулярном весе и нуклеотидном составе разных фракций РНК.

На рис. 2 показано разделение Ц-РНК, сорбированной на колонке при повышенной температуре или в присутствии NaClO<sub>4</sub>. Изменение условий сорбции РНК заставило ввести и иную процедуру элюции (использование только температурного градиента при постоянной концентрации элюирующего раствора). В результате удалось достигнуть, во-первых, отчетливого разделения рРНК на 2 компонента (что при обычной хроматографии на колонке МАК РНК из животных тканей было невозможным) и, во-вторых, получить плечо или острые пики на правом склоне кривой, соответствующей рРНК. Так как в цитоплазме не обнаружено РНК с высокими молекулярными весами, то, возможно, этот пик соответствует РНК с более высоким содержанием А + У.

Мы разработали метод избирательной сорбции на колонке МАК фракции РНК, наиболее прочно связывающейся с анионитом при использовании денатурирующих агентов (детали метода будут опубликованы в другом

месте). Ц-РНК в концентрации примерно 130  $\mu\text{g}/\text{мл}$  пропускается через колонку в растворе 0,45  $M$   $\text{NaCl}$ , 3  $M$  мочевины, 20  $mM$  ЭДТА ( $\text{pH}$  6,7) при комнатной температуре. В этих условиях происходит связывание очень незначительной по величине фракции, в то время как основная масса РНК ( $> 95\%$ ) не сорбируется. При пропускании значительных количеств Ц-РНК эту фракцию можно накопить в препаративных количествах. Колонка интенсивно отмывается от примеси рРНК исходным раствором, затем последовательно 0,6  $M$   $\text{NaCl}$  и 1,5  $M$   $\text{NaCl}$  при комнатной температуре и при

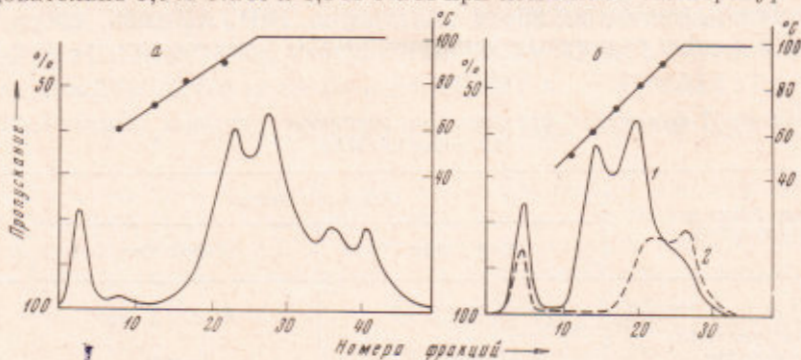


Рис. 2. Фракционирование Ц-РНК на колонке МАК с использованием денатурирующих агентов. *a* — сорбция РНК на колонке в 0,05  $M$   $\text{NaClO}_4$ , 20°, элюция 1,0  $M$   $\text{NaClO}_4$  в условиях градиента температуры (40—98°; по достижении 98° температура удерживается на одном уровне); *b* — сорбция РНК на колонке в 0,3  $M$   $\text{NaCl}$ , 60°, охлаждение колонки до 30°, промывание 1,5  $M$   $\text{NaCl}$ ; температурный градиент 40—98°. 1 — totalная Ц-РНК, 2 — ЦТ-фракция

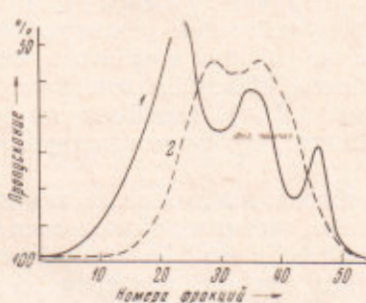


Рис. 3

Ультрацентрифугирование РНК в градиенте (5—20%) сахарозы (0,1  $M$   $\text{NaCl}$ , 0,01  $M$   $\text{Na}$ -ацетат, 1  $mM$  ЭДТА,  $\text{pH}$  5,1). Spinco L-2. Ротор SW-50, 37 000 об/мин, 200 мин., 4°. 1 — totalная Ц-РНК, 2 — ЦТ-фракция

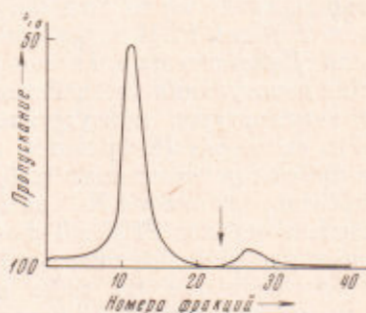


Рис. 4

Фракционирование ЦТ-фракции на колонке МАК в стандартных условиях (см. подпись к рис. 1)

37°. Интересующая нас фракция, обозначаемая как ЦТ-фракция, элюируется 1,5  $M$   $\text{NaCl}$  при 98° и составляет примерно 2% от исходного препарата Ц-РНК. После спиртовых пересадений в присутствии 5  $mM$  ЭДТА ЦТ-фракция подвергалась дальнейшему исследованию. На рис. 2б видно, что ЦТ-фракция элюируется в области плеча на правом склоне пика рРНК и, очевидно, является отличной от рРНК фракцией. Как видно на рис. 3, ЦТ-фракция гетерогенна, имеет максимум распределения в области 17 и 23 S. При фракционировании на колонке МАК в обычных условиях с применением солевого и температурного градиента (рис. 4) ЦТ-фракция выходит в области, где элюируется и рРНК и, следовательно, в этих условиях фракционирования обнаружена быть не может. Ниже приведен нуклеотидный состав Ц-РНК и ЦТ-фракции, определенный электрофоретически после

щелочного гидролиза РНК (среднее из трех определений):

Нуклеотиды	Ц	А	Г	У	Г + Ц/А + У
Тотальная Ц-РНК	29,2	19,6	35,5	15,7	1,83
ЦТ-фракция	21,8	24,8	31,8	21,6	1,45

Коэффициент специфичности ( $K = Г + Ц/А + У$ ) ЦТ-фракции значительно ниже, чем у рРНК, и приближается к ДНК-подобному. Данные ультрацентрифугирования и ионообменной хроматографии на колонке МАК не обнаружили сколько-нибудь значительного загрязнения ЦТ-фракции рРНК или наличия низкомолекулярных компонентов, что могло бы свидетельствовать о дегградации. Приближающийся к ДНК-подобному нуклеотидный состав, гетерогенность, невысокое содержание в цитоплазме ( $\sim 2\%$ ) позволяют предполагать, что ЦТ-фракция представляет собой цитоплазматическую мРНК.

Таким образом, метод фракционирования на колонке МАК с использованием денатурирующих агентов обеспечивает разделение компонентов рРНК и выявляет фракцию особо прочно связывающейся РНК, которая по ряду показателей сходна с цитоплазматической мРНК и может быть накоплена в препаративных количествах в описанных выше условиях ее избирательной сорбции.

Идентификация ЦТ-фракции с мРНК, входящей в состав полисом, является предметом наших дальнейших исследований.

Автор пользуется случаем выразить глубокую благодарность проф. В. С. Шапоту за ценное обсуждение и постоянное внимание к работе.

Институт экспериментальной и клинической онкологии  
Академии медицинских наук СССР  
Москва

Поступило  
20 X 1969

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> A. V. Lichtenstein, E. G. Piker, V. S. Shapot, *Biochem. et biophys. acta*, 138, 441 (1967). <sup>2</sup> E. G. Пикер, А. В. Лихтенштейн и др., *Вестн. АМН СССР*, 3, 26 (1968). <sup>3</sup> V. S. Shapot, A. V. Lichtenstein, E. G. Piker, *Intern. Symposium on Biochemistry of Ribosomes and Messenger RNA*, Reinhardtbrunn, DDR, 1967, p. 307. <sup>4</sup> K. A. Ellem, J. W. Sheridan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16, 505 (1964). <sup>5</sup> H. Harris, H. W. Fisher et al., *Proc. Roy. Soc. B*, 157, 177 (1963). <sup>6</sup> J. F. Houssais, G. Attardi, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 56, 616 (1966). <sup>7</sup> R. W. Shearer, B. J. McCarthy, *Biochemistry*, 6, 283 (1967). <sup>8</sup> В. Я. Арнон, Г. П. Георгиев, *ДАН*, 172, 716 (1967). <sup>9</sup> N. Sueoka, T. Y. Cheng, *J. Mol. Biol.*, 4, 161 (1962).