

Т. Ю. УГАРОВА, Ю. В. СВИТКИН, В. А. ГИНЕВСКАЯ, В. И. АГОЛ

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ТРАНСЛЯЦИЯ В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ
МАТРИЧНО-АКТИВНОЙ РНК ИЗ ЦИТОПЛАЗМЫ
КЛЕТОК АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ КРЕБС-II**

(Представлено академиком А. С. Спириным 27 II 1973)

В настоящей работе описывается выделение и некоторые свойства матрично-активной фракции РНК из цитоплазмы клеток асцитной карциномы Кребс-II. Принцип использованного метода основан на том, что большинство клеточных мРНК содержит на 3'-конце молекулы полиадениловую последовательность (¹⁻⁴); поэтому мРНК могут быть специфически адсорбированы на твердом носителе, на котором неподвижно закреплены комплементарные полинуклеотиды — поли (Т) или поли (У) (⁵⁻⁸).

Исходным материалом для выделения РНК служила постмитохондриальная надосадочная жидкость (фракция S₃₀) (⁹). Экстракцию РНК проводили по видоизмененному методу Бравермана (⁴) в двух вариантах.

1. К фракции S₃₀ добавляли пятикратный объем раствора, содержащего 0,1 М трис-НСl, рН 9,0, 10⁻³ М ЭДТА и 0,5% додецилсульфат натрия, и смесь встряхивали с равным объемом 80% фенола в течение 20 мин. при комнатной температуре. После охлаждения в ледяной бане и центрифугирования (20 мин., 12 000 g) водную фазу повторно обрабатывали фенолом. РНК из водной фазы осаждали добавлением двух объемов этанола, осадок трижды промывали 66% этанолом с 0,1 М NaCl и растворяли в буферном растворе ТН (0,1 М NaCl, 0,01 М трис-НСl, рН 7,5). Полученный таким способом препарат называли тотальной цитоплазматической РНК.

2. В ряде опытов проводили предварительную экстракцию фракции S₃₀ фенолом при рН 7,6 в течение 10 мин. В этих условиях в водную фазу переходят преимущественно рибосомальная и транспортная РНК, а основная часть поли(А)содержащей РНК остается связанной с белком в интерфазе (^{4, 10}). Экстракцию этой РНК из интерфазы проводили при рН 9,0, как описано в первом варианте.

Колонку с поли(У)-целлюлозой готовили (¹¹), используя целлюлозу для колоночной хроматографии фирмы Хемапол (Чехословакия) и К-соль поли(У) фирмы Реанал (Венгрия). Лيوфилизированную смесь этих веществ (8 мг поли(У) на 1 г целлюлозы) суспендировали в этаноле и облучали ультрафиолетом в течение 20 мин. на расстоянии 20 см от двух двоянных бактерицидных ламп БУФ-30. Поли(У), не связавшуюся с целлюлозой, отмывали водой, и колонку уравнивали раствором ТН. Приготовленная таким образом колонка удерживает 250—300 мкг поли(А) на 1 г сухого веса поли(У)-целлюлозы.

Раствор РНК (2,5—3,5 мг/мл) наносили на колонку при 4° в количестве до 30 мг на 1 г поли(У)-целлюлозы. Неадсорбированный материал удаляли промыванием раствором ТН на холоду. Как показано на рис. 1а, более 95% тотальной цитоплазматической РНК не задерживается на колонке при этих условиях (пик А). Адсорбированная РНК элюируется при более высокой температуре (25°) раствором с низкой ионной силой (0,01 М трис-НСl, рН 7,5) (пик В). Количество материала в пике В колебалось от 2,5 до 3,5% от тотальной цитоплазматической РНК; оно достигало 13% при использовании РНК, выделенной при рН 9,0 после предварительной обработки цитоплазматического экстракта фенолом при рН 7,6. Некоторое количество РНК может быть дополнительно элюировано с колонки водой при 25°. Элюируемая водой РНК по седиментационному поведению

существенно не отличается от РНК, содержащейся в пике *Б*. Поэтому в ряде опытов всю первоначально адсорбированную на колонке РНК элюировали водой, минуя стадию элюции буфером.

Дальнейшую очистку можно проводить путем рехроматографии материала из пика *Б* на поли(У)-целлюлозе (рис. 16).

В табл. 1 приведено сравнение нуклеотидного состава (определенного по методу ⁽¹²⁾) totalной РНК и материала из пика *Б*. Видно, что пик *Б* существенно обогащен ДНК-подобной РНК: отношение (Г + Ц) / (А + У) снижается с 1,62 до 0,92.

Таблица 1

Нуклеотидный состав фракций РНК, разделяемых на колонке с поли(У)-целлюлозой (среднее из двух определений)

Фракция РНК	Состав оснований, мол. %				$\frac{\Gamma + \text{Ц}}{\text{А} + \text{У}}$	$\frac{\text{ПУ}}{\text{ПИ}}$
	А	У	Г	Ц		
Тотальная цитоплазматическая РНК	18,0	20,2	34,2	27,6	1,62	1,09
РНК из пика <i>Б</i>	25,1	27,1	26,3	21,5	0,92	1,06

На рис. 2 показаны седиментационные профили полученных препаратов РНК. На линейный градиент 15–30% сахарозы на 0,01 *М* ацетатном буфере, рН 5,1, с 0,1 *М* NaCl и 0,5% додецилсульфатом натрия наносили около

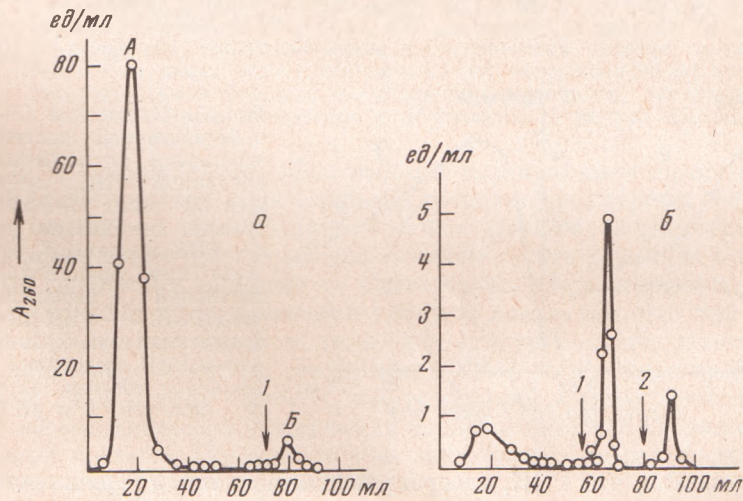


Рис. 1. Хроматография totalной цитоплазматической РНК на колонке с поли(У)-целлюлозой. *а* — фракционирование исходной РНК, *б* — рехроматография пика *Б*. 1 — 0,01 *М* трис-НСl, рН 7,5, 25°. 2 — Н₂О, 25°.

200 μ г РНК и центрифугировали при 22 000 об/мин., 16,5 час. в роторе SW(25)1 при 25°.

После двух циклов фракционирования в пике *Б* выявляется довольно гетерогенный материал, пики 28 S и 18 S заметно сглажены. В случае последовательной экстракции РНК фенолом при рН 7,6 и 9,0 уже после одного цикла хроматографии пики рибосомальной РНК не выявляются. Эти данные показывают, что использованный метод выделения поли(А)содержащей РНК позволяет получить ее в значительной степени освобожденной от рибосомальной РНК.

Матричную активность выделенной РНК определяли в гомологичной бесклеточной белок-синтезирующей системе, представляющей собой фракцию S_{30} , преинкубированную 50 мин. при 37° в условиях, обеспечивающих синтез белка в бесклеточной системе (⁹). Пробы, объемом 0,1 мл содержали по 30 μ л преинкубированной фракции S_{30} , указанные количества РНК: 30 мМ трис-НСl, рН 7,6; 3,5 мМ $MgCl_2$, 85 мМ КСl, 1,5 мМ АТФ, 0,1 мМ ГТФ, 0,6 мМ ЦТФ, 10 мМ креатинфосфата, 1,6 μ г/мл креатинкиназы, по 0,04 мМ каждой из 19 немеченых аминокислот и 0,003 мМ C^{14} -лизина (342 μ С/ммол.).

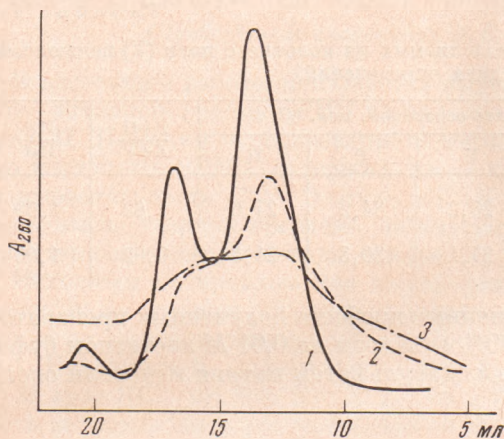


Рис. 2. Седиментационные профили тотальной цитоплазматической РНК и РНК, адсорбирующей на колонке с поли(У)-целлюлозой. 1 — тотальная цитоплазматическая РНК, 2 — та же РНК после двух циклов адсорбции — элюции на поли(У)-целлюлозе, 3 — РНК, выделенная путем последовательной экстракции при рН 7,6 и рН 9,0, после одного цикла адсорбции — элюции на поли(У)-целлюлозе

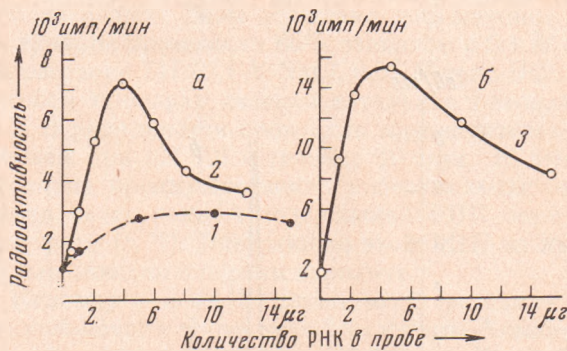


Рис. 3. Включение C^{14} -лизина в бесклеточной системе в зависимости от количества добавленной РНК. а — инкубация 60 мин. б — инкубация 90 мин. 1 — РНК из пика А и 2 — РНК из пика Б, обе получены при фракционировании тотальной цитоплазматической РНК. 3 — РНК из пика Б, полученная при фракционировании РНК, выделенной путем последовательных экстракций при рН 7,6 и рН 9,0

Было показано, что РНК, адсорбирующая на поли(У)-целлюлозе, стимулирует включение меченой аминокислоты в бесклеточной системе в 6—10 раз. Включение метки существенно зависит от концентрации внесенной РНК — синтез максимален при концентрации около 4 μ г на пробу и снижается при добавлении избытка РНК (рис. 3).

Продукты, синтезированные в бесклеточной системе под влиянием выделенной матричной РНК, были исследованы методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (^{13, 14}).

На рис. 4 показано, что в нашей системе образуется весьма гетерогенный набор белков; основная часть их представлена пептидами с молекулярными весами, примерно от 10 до 70 тысяч дальтон (оценка молекулярного веса проводилась на основании данных приведенных в работе (¹⁵)). Обращает на себя внимание то обстоятельство, что по электрофоретической подвижности продукты, образующиеся под влиянием экзогенной матрицы, несколько отличаются как от белков, синтезируемых в цельных клетках, так и от пептидов, синтезируемых в непринкубированной бесклеточной системе на эндогенных матрицах. Основное отличие заключается в

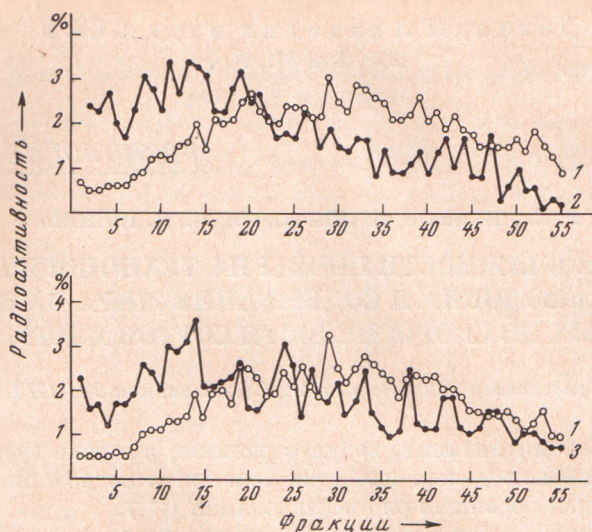


Рис. 4. Анализ продуктов, синтезированных в бесклеточной системе при добавлении РНК, адсорбирующей на поли(У)-целлюлозе. 1 — продукты, синтезированные под влиянием РНК из пика Б. Проба, объемом 0,2 мл, содержала 60 μ л преинкубированной фракции S₃₀, 6 μ г РНК и прочие компоненты, как указано в тексте. Время инкубации с C¹⁴-лизином (1 μ С/мл) 120 мин. 2 — продукты, синтезированные в неразрушенных клетках. 10⁷ кл/мл в растворе Эрла метили H³-лизином (1 μ С/мл, 250 μ С/ммол) в течение 40 мин. 3 — продукты, синтезированные в бесклеточной системе на эпдогенных матрицах. Проба, объемом 0,2 мл, содержала 60 μ л непринкубированной фракции S₃₀ и прочие компоненты, как указано в тексте. Время инкубации с H³-лизином (5 μ С/мл) 120 мин

том, что среди продуктов, образованных под влиянием экзогенной мРНК, относительно снижена доля наиболее высокомолекулярных белков и, наоборот, повышена доля белков с более низким молекулярным весом. В настоящее время трудно сказать связаны ли эти различия с тем, что некоторые экзогенные матрицы не считываются (или считываются хуже) в преинкубированной бесклеточной системе, или с тем, что при описанном методе выделения теряется (или деградирует) часть молекул мРНК.

Подводя итог, отметим, что фракция РНК, выделенная из цитоплазматической РНК клеток Krebs-II, имеет близкий к ДНК нуклеотидный состав и весьма активна в стимуляции белкового синтеза в гомологичной бесклеточной системе. Поэтому можно заключить, что эта фракция сильно обогащена информационными РНК.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова
Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
20 II 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. Lim, E. S. Canellakis, *Nature*, **227**, 710 (1970).
- ² J. E. Darnell, R. Wall, R. J. Tushinski, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1321 (1971).
- ³ M. Edmonds, M. H. Vaughan, H. Nakazato, *Ibid.*, **68**, 1336 (1971).
- ⁴ S. Y. Lee, J. Mendeski, G. Brawerman, *Ibid.*, **68**, 1331 (1971).
- ⁵ M. Edmonds, M. G. Caramela, *J. Biol. Chem.*, **244**, 1314 (1969).
- ⁶ R. H. Singer, S. Penman, *Nature*, **240**, 100 (1972).
- ⁷ H. Aviv, P. Leder, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1408 (1972).
- ⁸ U. Lindberg, T. Persson, *Europ. J. Biochem.*, **31**, 246 (1972).
- ⁹ H. Aviv, J. Boime, P. Leder, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2303 (1971).
- ¹⁰ R. P. Perry, J. La Torre et al., *Biochim. et biophys. acta*, **262**, 220 (1972).
- ¹¹ R. Sheldon, C. Jorale, J. Kates, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 417 (1972).
- ¹² S. Kats, D. C. Comb, *J. Biol. Chem.*, **238**, 9 (1963).
- ¹³ D. F. Summers, J. V. Maisel, J. E. Darnell, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **54**, 503 (1965).
- ¹⁴ V. J. Agol et al., *Virology*, **41**, 533 (1970).
- ¹⁵ V. A. Ginevskaya, J. V. Scarlet et al., *Arch. ges. Virusforsch.*, **39**, 98 (1972).