

УДК 547.962.32

БИОХИМИЯ

В. Н. КАГРАМАНОВ, В. Л. ДРУЦА, Н. В. ЧИЧКОВА, В. Д. СМИРНОВ,  
З. А. ШАБАРОВА, А. А. БОГДАНОВ,  
член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ

### ЗОНДИРОВАНИЕ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ РИБОСОМНОЙ РНК С ПОМОЩЬЮ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ

Несколько лет назад Уленбек и Доти (<sup>1</sup>) предложили новый метод изучения вторичной и третичной структур тРНК, суть которого состояла в выяснении способности молекулы нуклеиновой кислоты образовывать комплементарный комплекс с олигорибонуклеотидом известного строения. Из анализа констант связывания олигонуклеотида с тРНК можно делать заключение о пространственной организации ее макромолекулы, т. е. решить вопрос, в каком из двух — в однотяжевом или двуспиральном участке РНК находится та или иная ее нуклеотидная последовательность и каким образом эта последовательность расположена относительно «поверхности» макромолекулы. Этот метод нашел затем применение для изучения ряда транспортных РНК и 5S рибосомной РНК (<sup>2-5</sup>). Известное развитие он получил в работе Василенко и др. (<sup>6</sup>), которые предложили при комплексообразовании использовать смесь олигорибонуклеотидов известной длины, но со статическим распределением нуклеотидов (продукты гидролиза РНК неспецифической эндонуклеазой), а затем анализировать нуклеотидную последовательность связавшихся с РНК олигонуклеотидов.

В настоящей работе для изучения макромолекулярной структуры РНК использованы синтетические олигодезоксирибонуклеотиды известного строения, которые по-прежнему остаются более доступными соединениями, чем соответствующие олигорибонуклеотиды. Более подробно идея использования таких соединений обсуждается нами в предыдущем сообщении (<sup>7</sup>).

Объектом исследования была рибосомная 16S РНК, которую получали стандартным фенольно-детергентным методом из 30S субчастиц рибосом *E. coli*, штамм MRE 600 (<sup>8</sup>). Первичная структура этой РНК исследуется в лаборатории Эбеля Фельнером и сотрудниками и ее нуклеотидная последовательность установлена в настоящее время примерно на 70% (<sup>9</sup>). Синтез олигодезоксирибонуклеотидов проводили блочным методом так, как это было описано ранее (<sup>7, 10</sup>). Однородность олигонуклеотидов контролировалась колоночной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе в 7 М мочевины по методике Томлинсона — Тенера (<sup>11</sup>). Меченные тритием олигонуклеотиды получали разработанным нами методом изотопного обмена в условиях, когда обмен водорода на тритий происходит главным образом у С-8-пуринов и С-5-пиримидинов. Для этого примерно 20 о.е. олигонуклеотида нагревали 2—4 часа при 60—75° в 0,1—0,6 М растворе NaOH в тритиевой воде с исходной активностью около 20 С/моль. Раствор нейтрализовали CO<sub>2</sub> и лиофильно высушивали. Остаток еще 6 раз отгоняли со свежими порциями воды. Олигонуклеотид очищали хроматографией на бумаге в системе этиловый спирт — 1 М ацетат аммония (7 : 3). Удельная активность олигонуклеотидов составляла 0,04—0,2 мС/о.е.

В работе были использованы олигонуклеотиды следующего строения: d(pTCTT), d(pTGTG), d(pTATT), d(GTCTT), d(GTATT), d(pCCAAA). Их выбор определялся нуклеотидными последователями, а также схемами вторичной структуры больших фрагментов 16S РНК, в различное время опубликованными Фельнером и сотрудниками (<sup>12, 13</sup>). Изучение связыва-

пия олигонуклеотидов с 16S РНК проводилось в условиях, оптимальных для образования комплементарных комплексов — в 0,01 М трис-НСl-буфере, рН 7,8, содержащем 0,5 М NaCl и 0,001 М MgCl<sub>2</sub> при температуре 4° в течение 48 час. Олигонуклеотид смешивали с РНК при 20° и смесь охлаждали до 4°. В отдельных опытах раствор РНК предварительно нагревали при 60° и затем охлаждали до 20°. В другой серии опытов прогревали смесь олигонуклеотидов с 16S РНК.

Для отделения свободного олигонуклеотида от комплекса 16S РНК с олигонуклеотидом смесь либо хроматографировали на колонке с сефадексом G-50 или G-75, уравновешенной 0,01 М трис-НСl-буфером, рН 7,8, содержащем 0,5 М NaCl и 0,001 М MgCl<sub>2</sub> (размер колонки 1×50 см, скорость элюции 6 мл/час), либо фракционировали с помощью тонкослойной хроматографии на сефадексе G-75 в 0,05 М ацетатном буфере, рН 5,8, содержащем 0,25 М NaCl и 0,01 М MgAc<sub>2</sub>.

При колоночном варианте разделения за ходом элюции следили по у.-ф. поглощению фракции, и затем в каждой фракции просчитывалась радиоактивность в диоксановом сцинтилляторе на сцинтилляционном счетчике Марк-II («Нуклеар-Чикаго»). На рис. 1 показана типичная картина разделения реакционной смеси после образования комплекса 16S РНК с олигонуклеотидом d(pTCTT). Во втором случае пластинки просматривали в у.-ф. свете. У.-ф.-поглощающие зоны, а также зоны между ними соскабливали с пластинки, элюировали водой и элюат просчитывали в диоксановом сцинтилляторе. Молярное соотношение РНК:олигонуклеотид в комплексе определяли, исходя из у.-ф. поглощения РНК и известной удельной активности олигонуклеотида. Оба метода давали близкие результаты.

В табл. 1 приведены результаты изучения связывания олигодезоксирибонуклеотидов с 16S РНК. Исходя из полученных результатов, использованные нами олигонуклеотиды по характеру связывания с 16S РНК можно разделить на две группы: олигонуклеотиды, которые связываются с РНК в соотношении порядка 1:1 или более (d(pTCTT), d(pTGTG) и d(GTCTT)), и олигонуклеотиды, которые фактически с 16S РНК не связываются (d(pTATT), d(GTATT) и d(pCCAAA)). Что касается олигомеров d(pTATT) и d(GTATT), то полученные нами результаты находятся в соответствии с последними данными по первичной структуре с 16S РНК<sup>(9)</sup>. Ранее Фельнер и сотрудники<sup>(13)</sup> предполагали наличие комплементарной этим нуклеотидам последовательности во фрагменте В. Недавно они показали, что такая последовательность в этом фрагменте отсутствует.

Для олигонуклеотида d(pTGTG) имеется комплементарная последовательность в однопетлевом участке фрагмента А 16S РНК<sup>(9)</sup>. Вполне вероятно, что в нашем случае олигонуклеотид связывается с этой последовательностью. Единственная полностью комплементарная последовательность для олигонуклеотида d(pTCTT) обнаружена во фрагменте Т', причем предполагается, что этот участок РНК встроен в двупетлевую структуру<sup>(9)</sup>. Полученные в этой работе данные пока не позволяют сказать, насколько справедливо это предположение. Во-первых, наблюдаемая нами достаточно высокая степень связывания олигонуклеотида d(pTCTT) может отражать образование комплементарного комплекса с фрагментами 16S РНК, после-

Таблица 1  
Взаимодействие олигонуклеотидов  
с 16S РНК

№№ п.п.	Олигонуклеотид	Соотношение олигомер : РНК в исходной смеси	Соотношение олигомер : РНК в комплексе
1 *	d(pTCTT)	5 : 1	0,8 : 1
2 **	d(pTCTT)	5 : 1	0,8 : 1
3	d(pTCTT)	10 : 1	5 : 1
4	d(pTGTG)	10 : 1	0,9 : 1
5	d(pTATT)	30 : 1	0,003 : 1
6	d(GTCTT)	30 : 1	0,7 : 1
7	d(GTATT)	30 : 1	0,09 : 1
8	d(pCCAAA)	30 : 1	0,2 : 1

\* Комплексообразование проводили при комнатной температуре.

\*\* Раствор 16S РНК предварительно нагревали при 60°.

довательность которых еще не установлена. Во-вторых, для компактных макромолекул рибосомных РНК может существовать такая ситуация, когда олигонуклеотид образует комплементарный комплекс с нуклеотидными последовательностями, находящимися в разных, но смежных друг с другом однотяжевых участках. И, наконец, благодаря особой организации структуры рибосомной РНК тетра- и пентануклеотид может образовывать более стабильные, чем в обычных условиях, комплексы с многочисленными комплементарными тринуклеотидными последовательностями.

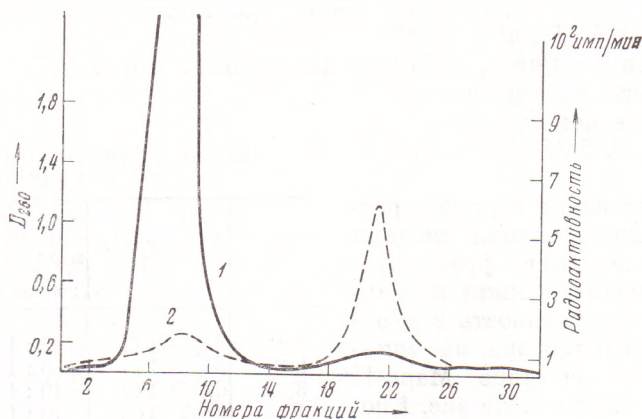


Рис. 1. Разделение реакционной смеси после образования комплекса 16S РНК с олигонуклеотидом d(pTCTT). Разделение проводили при 4°. 1 — изменение у-ф. поглощения, 2 — изменение радиоактивности во фракциях

Наиболее интересный результат настоящей работы, по нашему мнению, заключается в обнаруженном нами явлении сильного возрастания степени связывания олигонуклеотида d(pTCTT) с 16S РНК после прогревания реакционной смеси при 60° (табл. 1). Этот эффект является следствием существенной реорганизации исходной макромолекулярной структуры рибосомной РНК. Ранее было показано, что в этих условиях не происходит не только деградации РНК, но и заметного плавления ее вторичной структуры<sup>(8)</sup>. Следовательно, наблюдаемые в этой работе эффекты могут быть отнесены только к перестройке третичной структуры 16S РНК.

Таким образом, в настоящей работе показана принципиальная возможность применения синтетических олигодезоксирибонуклеотидов для зондирования макромолекулярной структуры рибосомных РНК. Хотя полученные результаты не могут интерпретироваться однозначно, их необходимо учитывать при построении модели вторичной и третичной структуры 16S РНК рибосом *E. coli*.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
8 X 1973

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> O. C. Uhlenbeck, J. Baller, P. Doty, *Nature*, **225**, 508 (1970). <sup>2</sup> J. B. Lewis, P. Doty, *Nature*, **225**, 510 (1970). <sup>3</sup> G. Högenauer, *Europ. J. Biochem.*, **12**, 527 (1970). <sup>4</sup> O. Pongs, E. Reinwald, K. Stamp, *FEBS Letters*, **16**, 275 (1971). <sup>5</sup> O. C. Uhlenbeck, *J. Mol. Biol.*, **65**, 25 (1972). <sup>6</sup> S. K. Vasilenko, V. N. Ankilova et al., *FEBS Letters*, **27**, 215 (1972). <sup>7</sup> B. H. Карамазов, В. Д. Смирнов и др., *ДАН*, **208**, 858 (1973). <sup>8</sup> И. Н. Шатский, Н. В. Чичкова, А. А. Богданов, *Молек. биол.*, **5**, 149 (1971). <sup>9</sup> P. Fellner, C. Ehresmann et al., *Nature New Biol.*, **239**, 1 (1972). <sup>10</sup> В. Д. Смирнов, В. Н. Карамазов и др., *Молек. биол.*, **6**, 292 (1972). <sup>11</sup> R. V. Tomlinson, G. M. Tener, *Biochemistry*, **2**, 697 (1963). <sup>12</sup> C. Ehresmann, P. Fellner, J. P. Ebel, *Nature*, **227**, 1321 (1970). <sup>13</sup> P. Fellner, *Biochimie*, **53**, 573 (1971).