

УДК 547.962.32

БИОХИМИЯ

В. Н. КАГРАМАНОВ, В. Л. ДРУЦА, И. 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 (1) 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 двусpirальном 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 (2-5). Известное развитие он получил в работе Василенко и др. (6), 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 (7).

Объектом исследования была рибосомная 16S РНК, которую получали стандартным фенольно-дегергентным методом из 30S субчастиц рибосом *E. coli*, штамм MRE 600 (8). Первичная структура этой РНК исследуется в лаборатории Эбеля Фельнером и сотрудниками и ее нуклеотидная последовательность установлена в настоящее время примерно на 70% (8). Синтез олигодезоксирибонуклеотидов проводили блочным методом так, как это было описано ранее (7, 10). Однородность олигонуклеотидов контролировалась колоночной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе в 7 M мочевине по методике Томлинсона — Тенера (11). 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 M 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 M ацетат аммония (7 : 3). Удельная активность олигонуклеотидов составляла 0,04—0,2 μС/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 (12, 13). Изучение связыва-

ния олигонуклеотидов с 16S РНК проводилось в условиях, оптимальных для образования комплементарных комплексов — в 0,01 M трис-HCl-буфере, pH 7,8, содержащем 0,5 M NaCl и 0,001 M 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 M трис-HCl-буфером, pH 7,8, содержащем 0,5 M NaCl и 0,001 M 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 M ацетатном буфере, pH 5,8, содержащем 0,25 M NaCl и 0,01 M 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 спиритилляторе на спиритилляционном 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 пластиинки просматривали в у.-ф. свете. У.-ф.-поглощающие зоны, а также зоны между ними соскабливали с пластиинки, элюировали водой и элюат просчитывали в диоксановом спиритилляторе. 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 (9). Ранее Фельнер и сотрудники (13) 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 однотяжевом участке фрагмента А 16S РНК (9). 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 двутяжевую структуру (9). 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.	Олигонуклео- тид	Соотноше- ние олиго- мер : РНК в исход- ной смеси	Соотношение олигомер : РНК в ком- плексе
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 сближенных друг с другом однотяжевых участках. И, наконец, благодаря особой организации структуры рибосомной РНК тетрапнуклеотид может образовывать более стабильные, чем в обычных условиях, комплексы с многочисленными комплементарными тринуклеотидными последовательностями.

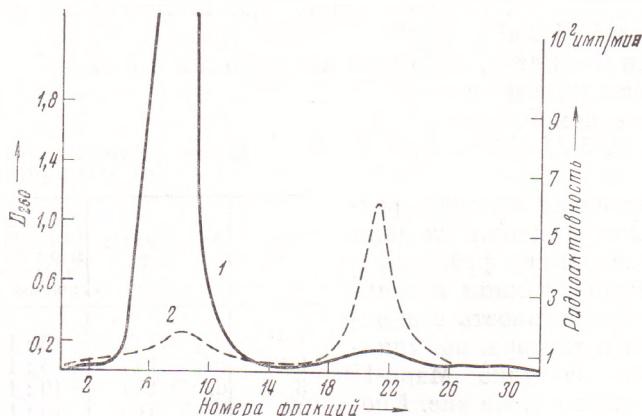


Рис. 1. Разделение реакционной смеси после образования комплекса 16S РНК с олигонуклеотидом d (рТСТТ). Разделение проводили при 4°. 1 – изменение у.-ф. поглощения, 2 – изменение радиоактивности во фракциях

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> В. Н. Каграманов, 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> R. Fellner, C. Ehresmann et al., *Nature New Biol.*, 239, 1 (1972). <sup>10</sup> В. Д. Смирнов, В. Н. Каграманов 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, R. Fellner, J. P. Ebel, *Nature*, 227, 1321 (1970). <sup>13</sup> R. Fellner, *Biochemie*, 53, 573 (1971).