

К. Г. ГАЗАРЯН, В. З. ТАРАНТУЛ, Ю. Н. БАРАНОВ,  
Л. Ю. ФРОЛОВА, Л. Л. КИСЕЛЕВ

## ГИБРИДИЗАЦИЯ ИНФОРМАЦИОННОЙ РНК ГЛОБИНА ГОЛУБЯ С КОМПЛЕМЕНТАРНОЙ ДНК, СИНТЕЗИРОВАННОЙ ПУТЕМ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

(Представлено академиком А. А. Баевым 30 I 1974)

С помощью обратной транскриптазы (ревертазы<sup>(1)</sup>) можно *in vitro* синтезировать цепи ДНК, комплементарные к информационным РНК животных<sup>(2, 3)</sup>. В настоящее время этим путем получены ДНК-копии нескольких видов мРНК<sup>(4-7)</sup>. Установлено, что продукт обратной транскрипции (кДНК\*) является гетерополимером с размерами, соизмеримыми с длиной мРНК, служившей матрицей, и комплементарен к ней. В то же время многие вопросы, касающиеся как самого механизма реакций, катализируемых ревертазой, так и структуры получаемого продукта, нуждаются в более детальном изучении.

В предыдущей работе<sup>(1)</sup> мы сообщили о получении ДНК, комплементарной к глобиновой мРНК голубя, и показали, что по основным параметрам продукт обратной транскрипции глобина голубя сходен с ДНК, синтезированными на матрицах глобиновых мРНК других животных<sup>(2-5)</sup>. В настоящей работе приводятся результаты дальнейшего изучения полученной кДНК методом гибридизации.

Процедура выделения ревертазы из вируса миэлобластома, 9S мРНК из полисом ретикулоцитов голубя, а также условия проведения ревертазной реакции и очистки продукта описаны ранее<sup>(1)</sup>. Использовался продукт, синтезированный в присутствии актиномина и  $[H^3]$ -ДГТФ в качестве меченого предшественника, удельная активность продукта  $10^6$  имп/(мин·мкг).

Гибридизацию РНК — ДНК проводили в 0,24 M Na-фосфатном буфере, рН 7,0 (ФБ), содержавшем 0,1% додецилсульфата Na в объеме 10—15 мкл. кДНК и мРНК (в соотношении 1:10 по весу), смешивали при комнатной температуре (18—20°) и отжигали в запаянных капиллярах в термостатированной бане. После отжига смесь быстро охлаждали и разводили либо 0,04 M ФБ для нанесения на колонку с гидроксиапатитом (ГАП), либо 0,03 M Na-ацетатным буфером, рН 4,5 для обработки нуклеазой S<sub>1</sub>. В последнем случае в пробы добавляли 0,03 мМ ZnSO<sub>4</sub>, 10 мМ NaCl, 20 мкг ДНК фага, 6 мкг белка препарата нуклеазы S<sub>1</sub>, полученного из такадиастазы (Takadiastase A, Sankyo, Japan) по Саттону<sup>(8)</sup>, и инкубировали 90 мин. при 37°. Кислотонерастворимый материал собирали на миллипоровые фильтры, радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике. Остальные методы, использованные в работе, описаны ранее<sup>(1)</sup>.

Как видно из приведенной табл. 1, в контрольных опытах нуклеаза S<sub>1</sub> гидролизует ~98% денатурированной ДНК фага, оставляя кислотонерастворимой всю нативную. Столь же эффективно гидролизуется исходный (обработанный щелочью) продукт ревертазной реакции, в том числе и в случае, когда не проводилась дополнительная его тепловая денатурация. В результате гибридизации с глобиновой мРНК голубя до 95% кДНК вхо-

\* Комплементарная ДНК.

дит в гибриды, устойчивые к нуклеазной обработке; с 28 S рРНК, полученной из тех же полисом, продукт практически не гибридизируется, что подтверждает специфичность гибридизации и матричный механизм синтеза кДНК.

Гибриды кДНК — мРНК были также охарактеризованы путем хроматографии и плавления (температурной элюции) на колонке с ГАП (рис. 1, 2). Видно, что исходная одонитевая кДНК и гибриды хорошо разделяются

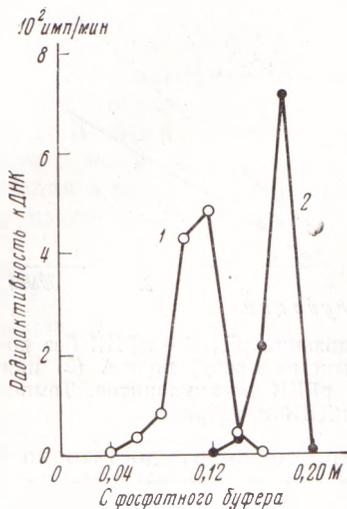


Рис. 1

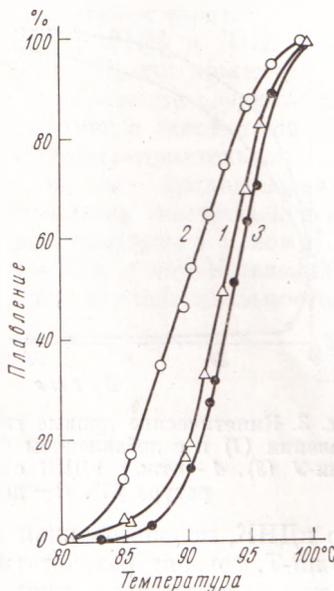


Рис. 2

Рис. 1. Солевая элюция кДНК (1) и гибридов кДНК — мРНК (2) с ГАП. Температура элюции 72°

Рис. 2. Температурная элюция гибридов кДНК — мРНК (1), фрагментированных ДНК ретикулоцитов голубя (2) и *E. coli* (3) с гидроксипатита. Нативную ДНК и гибриды связывали с ГАП в 0,12 М ФБ при 72°, промывали 0,06 М ФБ и затем проводили элюцию этим буфером при разных температурах

при солевой элюции с ГАП. На рис. 2 показан профиль плавления (температурной элюции с ГАП (°)) полученных гибридов. Здесь же в качестве маркеров нанесены кривые плавления фрагментированных (до ~7 S) ДНК ретикулоцитов голубя (39,5% ГЦ) и *E. coli* (50% ГЦ). Хорошо видно, что гибриды кДНК — мРНК имеют примерно такую же температуру и ширину интервала плавления, как ДНК *E. coli*. Из этих данных можно оценить ГЦ-состав 9 S мРНК ретикулоцитов голубя и комплементарной к ней ДНК. Получаемая оценка (~50% ГЦ) находится в пределах разброса существующих данных о ГЦ-содержании глобиновых мРНК других видов животных (<sup>5</sup>, <sup>10</sup>, <sup>11</sup>). Приведенные результаты, как и прежние (<sup>1</sup>), свидетельствуют о том, что синтезированный путем обратной транскрипции продукт является одонитевым и комплементарен к глобиновой мРНК голубя.

Следующий вопрос, рассматриваемый в данной работе, касается кинетики гибридизации глобиновой мРНК с кДНК. Кинетическую кривую гибридизации в стандартных условиях, представленную на рис. 3, 1, удается преобразовать в линейную форму, используя уравнение реакции второго порядка. Вместе с тем, из рассмотрения кинетической кривой можно видеть, что скорость реакции на начальном этапе гибридизации сильно увеличена. При гибридизации кДНК с мРНК глобина уток также была отмечена очень большая константа скорости реакции (<sup>2</sup>). Можно было предположить, что отклонение, наблюдаемое на начальном участке кривой гибри-

дизации, вызвано взаимодействием гомополимерных участков реагирующих молекул (последовательностей поли-А в мРНК и считанных с них поли-Т в кДНК). На возможность считывания поли-А-последовательностей мРНК при обратной транскрипции указывалось неоднократно (6), однако экспериментально не выяснено, в какой степени эта возможность реализуется.

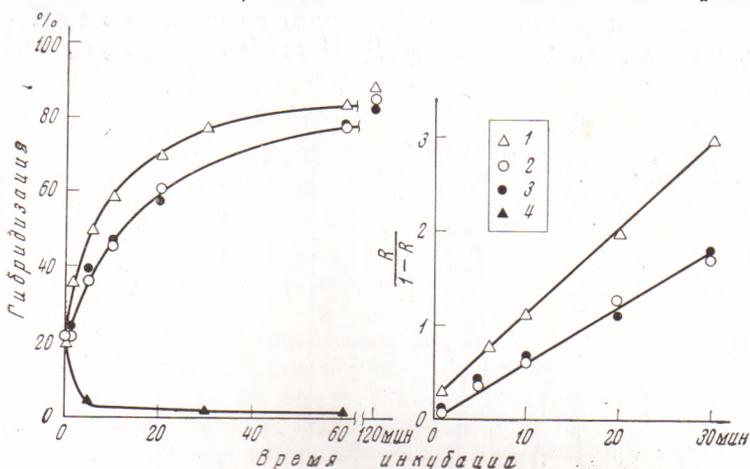


Рис. 3. Кинетические кривые гибридизации кДНК – мРНК без добавления (1) и с добавлением (0,5 мкг на пробу) поли-А (2) или поли-У (3). 4 – отжиг кДНК с 28 S рРНК ретикулоцитов. Температура 67°. R – доля кДНК в гибриде

О том, что кДНК, использованная нами, содержит достаточно большие участки поли-Т, говорят результаты их отжига с поли-А (табл. 1). Если кДНК, меченную по тимину, отжигать с поли-А, то ~45% радиоактивности кДНК остается во фракции, не гидролизуемой нуклеазой S<sub>1</sub>. Этого не наблюдается при отжиге с поли-А кДНК, меченной по гуанину.

Таблица 1

Компоненты смеси	Условия отжига	ДНК, устойчивая к нуклеазе S <sub>1</sub> , %
C <sup>14</sup> -ДНК фага T <sub>4</sub>		
Нативная Денатурированная	Без отжига	106
	Без отжига	1,2
кДНК H <sup>3</sup> -ДГМФ		
Без добавок		5,5
Без добавок	10 мин., 100°	5,4
С мРНК	120 мин., 67°	94,5
С рРНК	120 мин., 67°	7,5
С мРНК	1 мин., 2°	20
С мРНК и поли-А	1 мин., 2°	21,5
С мРНК	1 мин., 20°	34
С мРНК и поли-А	1 мин., 20°	19,5
С мРНК	20 мин., 42°	35
С мРНК и поли-А	20 мин., 42°	21
С поли-А	60 мин., 60° → 20°	5,1
кДНК H <sup>3</sup> -ДТМФ		
Без добавок	Без отжига	5,1
С поли-А	60 мин., 60° → 20°	45

Если реакция гибридизации мРНК с кДНК ускорена благодаря быстрому взаимодействию их гомополимерных участков, то это влияние можно выявить, проводя гибридизацию в присутствии избытка немеченых поли-А или поли-У. Из рис. 3 хорошо видно, что добавление этих гомополимеров приводит к одинаковому эффекту: в обоих случаях константа скорости реакции уменьшается в 1,5 раза, а ход кривой гибридизации в начальной области приходит в соответствие с теоретически ожидаемым для кинетики реакции второго порядка. Нормализация кинетической кривой, достигаемая добавлением поли-А для экранировки поли-Т-последовательностей в кДНК или поли-У для экранировки поли-А в мРНК, свидетельствует об участии гомополимерных последовательностей кДНК и мРНК в гибридизации.

В условиях, при которых проводилась гибридизация (0,36 M Na<sup>+</sup>, 67°) не должны образовываться стабильные поли-А — поли-Т комплексы (<sup>12</sup>). Несмотря на это, их взаимодействие оказывается достаточным, чтобы инициировать гибридизацию связанных с ними гетерополимерных участков. Если гибридизацию проводить при температуре 42° (являющейся оптимальной для образования комплексов поли-А — поли-Т (<sup>12</sup>)) или при комнатной температуре (табл. 1), то и в этих условиях, как видно, из эффекта добавления поли-А, скорость реакции на начальном этапе оказывается увеличенной. Комплементарные ДНК, получаемые путем обратной транскрипции, используются в опытах по гибридизации с мРНК и ДНК без учета описанных здесь кинетических особенностей (<sup>5</sup>, <sup>13</sup>), что может быть источником погрешностей при количественной интерпретации результатов.

Таким образом, в работе показано, что наличие в одной и той же молекуле гомо- и гетерополимерных нуклеотидных последовательностей приводит к тому, что гибридизация гетерополимерных последовательностей мРНК и ее ДНК-копии катализируется быстрым взаимодействием их поли-А и поли-Т участков, что усложняет всю кинетику в целом. Следовательно, аномалия в кинетике гибридизации кДНК и мРНК связана с присутствием в каждой из них гомополимерных последовательностей.

Институт атомной энергии  
им. И. В. Курчатова

Поступило  
24 I 1974

Институт молекулярной биологии  
Академии наук СССР  
Москва

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Л. Л. Киселев, Л. Ю. Фролова и др., ДАН, т. 213, 1203 (1973). <sup>2</sup> D. L. Kacian, S. Spiegelman et al., Nature New Biol., v. 235, 167 (1972). <sup>3</sup> I. M. Verma, G. F. Temple et al., Nature New Biol., v. 235, 163 (1972). <sup>4</sup> J. Ross, H. Aviv et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 69, 264 (1972). <sup>5</sup> J. O. Bishop, M. Rosbach, Nature New Biol., v. 241, 204 (1972). <sup>6</sup> H. Diggelmann, C. H. Faust, B. Mach, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, 693 (1973). <sup>7</sup> A. J. N. Berns, H. Bloemendal et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 52, 1013 (1973). <sup>8</sup> W. D. Sutton, Biochim. et biophys. acta, v. 240, 522 (1971). <sup>9</sup> M. McCallum, P. M. B. Walker, Biochem. J., v. 105, 163 (1967). <sup>10</sup> G. Attardi, H. Parnas, B. Attardi, Exp. Cell. Res., v. 62, 11 (1970). <sup>11</sup> R. W. Williamson, M. Morrisson, Biochemistry, v. 10, 3014 (1971). <sup>12</sup> J. Wetmur, C. Lee, Biopolymers, v. 11, 1485 (1972). <sup>13</sup> T. Imaizumi, H. Diggelmann, K. Scherrer, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 70, 1122 (1973).