

В. Г. МЕТЕЛЕВ, О. Б. СТЕПАНОВА, В. Д. СМИРНОВ, З. А. ШАБАРОВА,
член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ, Л. Ю. ФРОЛОВА,
Н. А. ГРАЕВСКАЯ, Л. Л. КИСЕЛЕВ

**ИЗБИРАТЕЛЬНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ ФАГОВОЙ РНК-РЕВЕРТАЗОЙ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ «АДРЕСОВАННОЙ» ЗАТРАВКИ**

В этой работе мы поставили перед собой задачу найти подход к созданию управляемой системы обратной транскрипции, которая позволила бы вести синтез ДНК в принципе с любой заранее выбранной начальной точки на матрице. Поскольку синтез начинается с затравки, то образование комплекса между заранее выбранной, определенной областью РНК-матрицы и комплементарным олигодезоксирибонуклеотидом — затравкой — должно в принципе контролировать получение требуемой ДНК-копии. Такой «адресованный» олигодезоксирибонуклеотид может быть синтезирован химическим путем с учетом комплементарности оснований к участку матрицы с известной последовательностью нуклеотидов.

РНК-содержащие фаги, имеющие хорошо изученное генетическое и химическое строение ⁽¹⁾, представляют собой практически идеальную модель для решения указанных вопросов. Особенно удобны фаги R17 и MS2, имеющие по три гена и в значительной степени известную последовательность нуклеотидов, включая межцистронные области (схема 1). Первич-

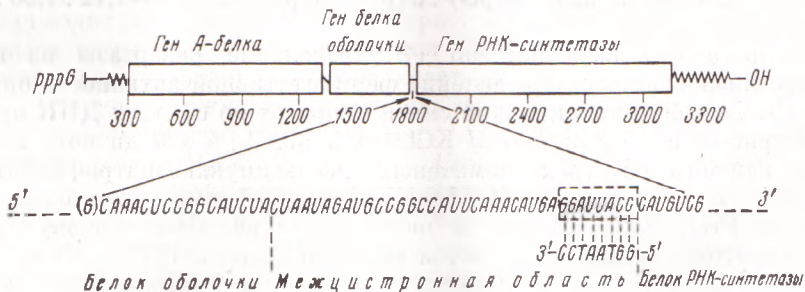
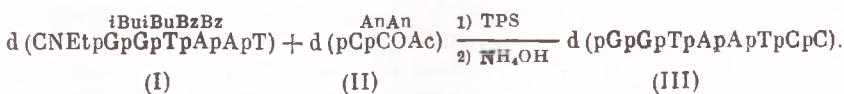


Схема 1. Структура генома фага R17 ⁽²⁾ и межцистронной нетранслируемой области ^(2, 3).

ная структура 30-членного участка между генами белка оболочки и РНК-синтетазы известна ^(2, 3). Нами были синтезированы окта- и гекса-дезоксирибонуклеотиды, имеющие при антипараллельной ориентации цепей комплементарную к участку межцистронной области последовательность оснований (схема 1).

Синтез гексадезоксирибонуклеотида d(pGpGpTpApApT) описан ⁽⁴⁾. Октадезоксирибонуклеотид синтезирован из описанного ранее гексануклеотида I по схеме*:



* Принятые сокращения: CNEt — цианэтил, Bz — бензоил, iBu — изобутил, Ap — анизол, OAc — ацетил, TPS — триизопрпилбензолсульфохлорид.

При синтезе использовали 50-кратный избыток динуклеотида II, конденсацию проводили в присутствии TPS 2,5 часа. Реакционную смесь обрабатывали концентрированным водным аммиаком при 50° 7 час. и экстрагировали эфиром. Октануклеотид III выделяли хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе А-25 (СI-форма) в 7 М мочеvine с последующим обессоливанием. После дополнительной очистки хроматографией на бумаге в системе н-пропанол — аммиак — вода (55:10:35 по объему) октануклеотид III выделен с выходом 11%. Гомогенность препарата подтверждена хроматографией на микроколонке с ДЭАЭ-целлюлозой при pH 7,5 (5) и электрофорезом в буфере 0,19 М β-аланин — 0,01 М HCl — каприловая кислота,

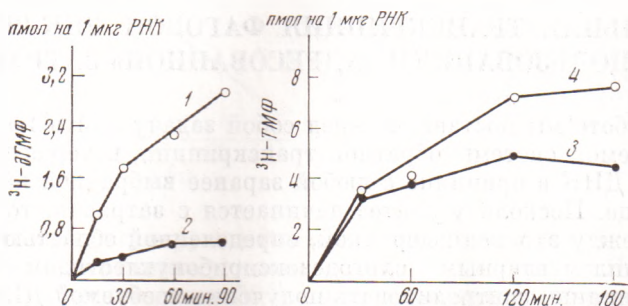


Рис. 1. Зависимость РНК-направляемого синтеза ДНК от времени. 1 — включение в кислотонерастворимую фракцию в присутствии октануклеотида рGrGrTrArArTrCrC в инкубационной смеси, преинкубация 30 мин., 37°; 2 — то же в присутствии гексануклеотида рGrCrTrArArT; 3 — включение в кислотонерастворимую фракцию без преинкубации и 4 — с преинкубацией РНК с октануклеотидом 2 часа при 45°

pH 3,5. Соотношение продуктов гидролиза октануклеотида III фосфодиэстеразой змеиного яда d(pG) : d(pT) : d(pA) : d(pC) = 1,12 : 1,00 : 1,11 : 0,89.

РНК фага R17 выделяли по (6). Выделение ревертазы из вируса птичьего миеобластога, определение ферментативной активности описаны ранее (7). Состав инкубационной смеси в опытах по синтезу ДНК при 37°: 0,05 М трис-HCl, pH 8,3; 0,06 М KCl, 6 мМ MgCl₂, 4 мМ дитиотреитол, по 0,2 мМ каждого из трех немеченых дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и 0,02 мМ $^3\text{H-dTTP}$ или $^3\text{H-TTP}$ (1000–1500 имп/мин·пмоль), 20–30 мкг/мл РНК R17, 2,5 мкг/мл окто- или гексадезоксирибонуклеотида (40–60-кратный молярный избыток по отношению к РНК), 10 ед/мл ревертазы (1 ед. фермента катализирует включение 1 пмоля ТМФ в стандартных условиях с полиА-олиго(dT)₁₀). Проводили определение размеров ДНК-продукта в градиенте концентрации сахарозы. Продукт после депротенизации, обработки 0,3 N KOH (95°, 15 мин.) с последующей нейтрализацией, осажден спиртом, растворен в 0,05 М трис HCl-буфере, pH 7,5, и нанесен на градиент концентрации сахарозы 10–35%, содержащей 0,1 М NaCl, 0,05 М трис-HCl, pH 7,5. Центрифугирование 18 час. при 39000 об/мин. SW50, «Spinco» L50,4°. Фракции по 0,16 мл осаждали ТХУ, осадки переносили на миллиметровые фильтры и определяли радиоактивность на спинтилляционном счетчике «Intertechnique» SL-30. Опыты показали, что РНК фага R17 в полной системе обратной транскрипции, но в отсутствие олигодезоксирибонуклеотида не обладает матричной активностью в синтезе полидезоксирибонуклеотидов.

Инкубационная смесь

Включение $^3\text{H-dTTP}$ за 2 часа в кислото-
нерастворимую фракцию,
пмоль на 1 мкг РНК

Полная	7,0
Без октануклеотида	0,4
Без РНК R17	0,6
Без ревертазы	0,2

Только при одновременном присутствии РНК фага, ревертазы и затравочного олигодезоксирибонуклеотида наблюдается значительное включение, регистрируемое как с ^3H -дГТФ, так и с ^3H -ТТФ. Если длину затравки уменьшить с 8- до 6-членной, т. е. на две ГЦ-пары, то включение резко уменьшается (рис. 1, 1, 2). Это наблюдение полностью соответствует данным по резко ослабленной способности гексамера (⁸) по сравнению с октамером давать комплекс с РНК фага R17.

Как видно из приводимых ниже данных, количество синтезированной ДНК зависит от количества взятой в опыт матрицы-затравки и, следовательно, не лимитируется концентрацией фермента.

Количество РНК в 0,1 мл полной инкубационной смеси, мкг	Включение ^3H -дГМФ за 1 час в кислотоне- растворимую фракцию цмоли на пробу
1,3	3,8
2,6	12,0
3,8	21,5

Реакция выходит на плато к ~ 2 час. инкубации при 37° (рис. 1, 3, 4). Предварительное выдерживание октануклеотида с РНК 2 часа при 45° («отжиг») заметно увеличивает эффективность системы (рис. 1, 3, 4).

ДНК-продукт при центрифугировании в градиенте концентрации сахарозы дает широкий пик с максимумом около $\sim 7\text{S}$ (рис. 2). Эти средние размеры соответствуют последовательности не менее чем в 400 мономеров. После обработки щелочью ДНК-продукт дает пик с плотностью, характерной для денатурированной ДНК (рис. 3 а). Гибридизация с РНК фага R17 приводит к появлению пика (рис. 3 б), имеющего плотность, характерную для РНК — ДНК-гибрида, в котором преобладает РНК (этого и следовало ожидать, учитывая, что обратная транскрипция подвергается только небольшая часть РНК матрицы). Сохранение после гибридизации пика, соответствующего однотяжевой ДНК (рис. 3 б), объясняется тем, что реакцию проводили без актиномицина D в инкубационной смеси, и поэтому среди продуктов реакции, помимо нитей ДНК, комплементарных РНК-матрице, могли быть и продукты ДНК-зависимого синтеза.

Изложенные данные показывают, что действием ревертазы осуществлен синтез ДНК, инициированный гетерополимерной затравкой, комплементарной к участку межцистронной области генома фага R17. Необходимость затравки для реакции, а также получение молекулярного гибрида между РНК и новосинтезированной ДНК свидетельствуют о комплементарном характере копирования матрицы. Размеры ДНК продукта ($\sim 150\ 000$ дальтон) достаточны для кодирования белка оболочки фага, состоящего из 129 аминокислот.

Представляет значительный интерес вопрос о том, почему в описанной системе транскрибируется, если судить по размерам ДНК-продукта, только один из двух генов (схема 1) — белка оболочки, но не А-белка. Возможны два объяснения: либо в структуре РНК-матрицы имеется скрытый разрыв, препятствующий дальнейшему синтезу, либо особенности пространственной или первичной структуры межгенной области, или начала гена А-белка, или конца гена белка оболочки таковы, что создают препятствия для считывания РНК, т. е. имеется сигнал(ы) для терминации транскрипции. Этот вопрос нуждается в отдельном изучении.

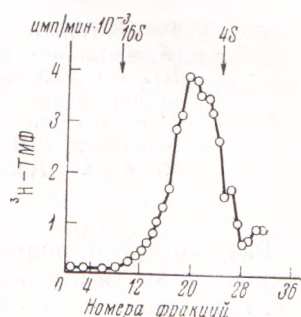


Рис. 2. Определение размеров ДНК-продукта в градиенте концентрации сахарозы

Избирательная обратная транскрипция одного из трех генов полицистронного генома показывает, что при получении индивидуальных генов или их копий в качестве матриц обратной транскрипции могут служить не только реплики с отдельных генов или сами гены, но и более сложные полигенные нуклеотидные последовательности.

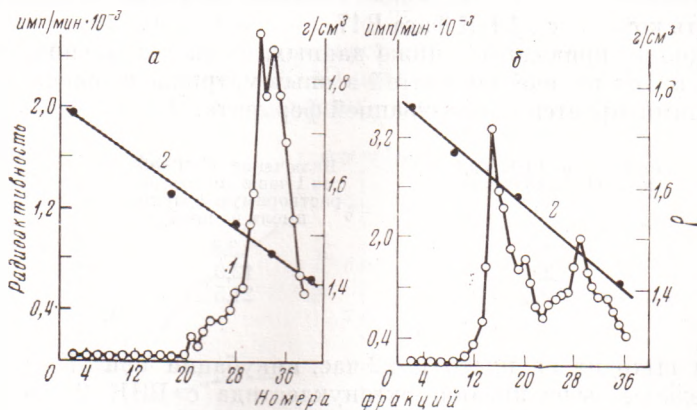


Рис. 3. Анализ в градиенте плотности Cs_2SO_4 ДНК-продукта (1), обработанного щелочью (а) и после его гибридизации с РНК R17 (б). Условия гибридизации в присутствии формамида приведены ранее (7). Центрифугирование при 40 000 об/мин, $\text{Ti}50$, 64 часа, «Spinco», 10°C . Во фракциях определяли плотность (2), добавляли РНК-носитель и воду до 1 мл и осаждали добавлением ТХУ. Далее, как в опытах с определенным размером ДНК в сахарозном градиенте

Разработанный подход применим к любым полирибонуклеотидным последовательностям, имеющим фрагменты с известной первичной структурой, при условии получения соответствующего синтетического комплементарного олигодезоксирибонуклеотида — затравки. Система обратной транскрипции, направляемая адресованной затравкой, открывает новые возможности изучения структуры и функции генетического аппарата клеток и вирусов.

Авторы выражают глубокую признательность за постоянное внимание и поддержку академику В. А. Энгельгардту, руководителю проекта «Ревертаза», в рамках которого выполнена данная работа.

Авторы выражают благодарность проф. И. Г. Агабекову и Н. П. Родионовой за содействие в вирусологической части работы и Я. Мелдрайсу за участие в анализе ДНК-продукта.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
26 IV 1974

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов
Академии медицинских наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Э. Я. Грен, Регуляторные механизмы репликации РНК-содержащих бактериофагов, Рига, 1974. ² J. A. Argetsinger-Steitz, Nature, v. 224, 957 (1969). ³ A. Bernardi, P.-F. Spahr, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 69, 3033 (1972). ⁴ В. Г. Метелев, В. Л. Друца и др., ДАН, т. 215, № 2 (1974). ⁵ М. А. Грачев, В сборн. Ультрамикроанализ нуклеиновых кислот, «Наука», 1973, стр. 118. ⁶ R. F. Gesteland, H. Voeltker, J. Mol. Biol., v. 8, 496 (1964). ⁷ Л. Л. Киселев, Л. Ю. Фролова и др., ДАН, т. 213, 1203 (1973). ⁸ О. Б. Степанова, В. Г. Метелев, Н. П. Родионова, Матер. симпозиума: Структура и функция нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов, 1974, стр. 116.