

В. А. НОСКОВ

**ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ПУРИНОВЫХ ИЗОПЛИТОВ  
В 16S- И 23S-РИБОСОМНЫХ РНК ESCHERICHIA COLI MRE-600**

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 18 XI 1971)

Показано, что РНК 30S- и 60S-субъединиц бактериальных рибосом различаются по нуклеотидному составу<sup>(1)</sup> и последовательности нуклеотидов в расшифрованных их фрагментах<sup>(2)</sup>. Частоты встречаемости пуриновых последовательностей в РНК 30S- и 60S-субъединиц бактериальных рибосом изучены недостаточно. Чтобы уточнить существующие представления о степени специфичности первичных структур таких РНК, мы исследовали молярную концентрацию моно-, ди-, три-, тетра-, пента-, гекса- и гептануклеотидов, образующихся при ферментативном гидролизе рибосомных 16S- и 23S-РНК, выделенных из *E. coli* MRE-600. Бактериальную массу собирали в середине логарифмической фазы роста и хранили при  $-20^{\circ}$ . Для выделения рибосом бактериальную массу растирали с окисью алюминия и гомогенат фракционировали дифференциальным центрифугированием<sup>(3)</sup>. Полученные рибосомы хранили на холоду в виде суспензии в растворе сульфата аммония<sup>(4)</sup>.

Поскольку при выделении РНК непосредственно из целых рибосом возможно загрязнение 16S-РНК продуктами частичной деградации 23S-РНК, РНК выделяли из субъединиц. Субъединицы разделяли методом зонального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (от 10 до 20%, центрифуга «Super Speed» 65, MSE, алюминиевый ротор

Таблица 1  
Escherichia coli MRE-600

№ фракции	16S, мол. %	23S, мол. %	P
1	19,69 ± 1,61	18,23 ± 0,31	< 0,95
2	22,15 ± 0,17	20,03 ± 0,28	> 0,95
3	19,74 ± 1,20	20,86 ± 0,06	< 0,95
4	13,97 ± 0,23	14,59 ± 0,05	< 0,95
5	8,83 ± 0,19	9,18 ± 0,03	< 0,95
6	5,20 ± 0,20	4,79 ± 0,13	< 0,95
7	3,27 ± 0,18	4,16 ± 0,03	> 0,95
1M NaCl	7,14 ± 1,37	8,14 ± 0,28	< 0,95

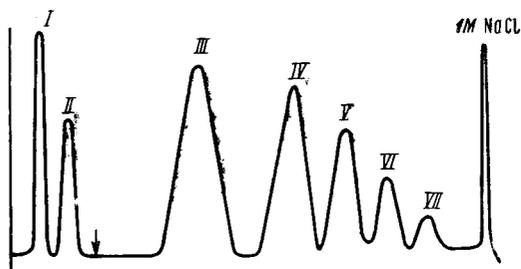
в XIV) по<sup>(5)</sup>. Чистоту полученных препаратов субъединиц дополнительно проверяли методом аналитического ультрацентрифугирования. РНК экстрагировали SDS-фенольным методом.

Препараты 16S- и 23S-РНК растворяли в 0,02 M трис-НСl-буфере, содержащем 0,001 M ЭДТА<sup>(6)</sup>. В раствор добавляли предварительно прогретую 15 мин. при  $80^{\circ}$  панкреатическую рибонуклеазу (завод медпрепаратов, Ленсовнархоз), растворенную в 0,01 M Na-ацетатном буфере, рН 5, содержащем 0,1 M NaCl из расчета соотношения фермент — субстрат 1:100 по весу<sup>(6, 8)</sup>. Гидролиз проводили 36 час. при  $37^{\circ}$  в присутствии 1—2 капель толуола. Гидролиз прерывали 10-кратным разведением реакционной смеси холодным 0,05 M трис-НСl-буфером, рН 7,5, содержащим 7M мочевины, и полученный раствор наносили на колонку.

Олигонуклеотиды разделяли по методике, описанной Томлинсоном и Тенером<sup>(9)</sup> с некоторыми модификациями. Колонку 0,5 × 40 см, напол-

ненную ДЕАЕ-сефадексом в  $\text{Cl}^-$ -форме, уравнивали вышеуказанным буфером. Моно- и динуклеотидная фракция смывались при ступенчатом повышении концентрации  $\text{NaCl}$  в том же буфере до  $0,075 \text{ M}$  и  $0,09 \text{ M}$  соответственно. Дальнейшее разделение олигонуклеотидов производили, используя линейный градиент концентрации  $\text{NaCl}$  от  $0,1 \text{ M}$  до  $0,45 \text{ M}$  в том же буфере. Общий объем элюирующего буфера  $350 \text{ мл}$ . После окончания градиентной элюции остатки материала смывали с колонки  $1 \text{ M}$  раствором  $\text{NaCl}$  в том же буфере. Процесс градиентной элюции вели в течение  $14 \text{ час}$ . при комнатной температуре. Регистрация результатов разделения проводилась при помощи проточного регистрирующего у.-ф. фотометра, сконструированного в оптико-механических мастерских лаборатории. Фракции, соответствующие изоплитам разной длины, собирали при помощи коллектора и доводили до определенного объема и  $\text{pH} 12$ , после чего измеряли поглощение на СФ 4-А при длине волны  $260$  и  $300 \text{ мμ}$ . Количество олигонуклеотидного материала в каждой фракции рассчитывали по формуле, предложенной Фирсом (<sup>10</sup>). Примененный нами метод позволил осуществить надежное разделение ферментативных гидролизатов РНК на

Рис. 1. Стрелка — начало градиентной элюции. Скорость элюции первой, второй и молярной фракции  $75 \text{ мл/час}$ . Скорость градиентной элюции  $25 \text{ мл/час}$



фракции, соответственно моно-, ди-, три- вплоть до гептануклеотидов. Один из типичных профилей элюции показан на рис. 1.

Полученные результаты сведены в табл. 1, в которой приведены данные о количественном содержании изоплитов разной длины в сравниваемых гидролизатах 16S- и 23S-РНК *E. coli* и уровни достоверности различий между средними для каждого класса изоплитов.

Как видно из табл. 1, в рибосомных РНК *E. coli* MRE-600 с наибольшей частотой встречаются последовательности пурин — пурин — пиримидин. Молярная доля последовательностей, содержащих три и более пуринов, закономерно уменьшается с увеличением их длины. Полученные данные согласуются с данными других авторов по количественному содержанию пуриновых последовательностей в 16S-РНК *E. coli* MRE-600 (<sup>6</sup>) и 16S- и 23S-РНК *E. coli* Q-13 (<sup>7</sup>). Наблюдаемые различия в количестве мононуклеотидов могут быть объяснены различиями в условиях гидролиза, но этот вопрос еще нуждается в выяснении. Из табл. 1 следует, что 16S- и 23S-РНК статистически достоверно отличаются по частоте встречаемости в них ди- и гептануклеотидов. Из полученных нами данных можно заключить, что изоплитный анализ рибосомных РНК разных субъединиц позволяет установить существование заметных различий в их первичной структуре.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
13 X 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> J. E. M. Midgley, *Biochim. et biophys. acta*, **61**, 513 (1962). <sup>2</sup> P. Fellner, J. P. Ebel, *Nature*, **225**, 1131 (1970). <sup>3</sup> A. Tissieres, J. D. Watson et al., *J. Mol. Biol.*, **1**, 221 (1959). <sup>4</sup> C. C. Kurland, *J. Mol. Biol.*, **18**, 90 (1966). <sup>5</sup> N. G. Anderson, *J. Phys. Chem.*, **66**, 1984 (1962). <sup>6</sup> A. Muto, *Biochemistry*, **9**, 19 (1970). <sup>7</sup> F. Amaldi, G. Attardi, *J. Mol. Biol.*, **33**, 737 (1968). <sup>8</sup> H. Maruyama, D. Mizuno, *Biochim. et biophys. acta*, **199**, 166 (1970). <sup>9</sup> R. V. Tomlinson, G. M. Tenner, *Biochemistry*, **2**, 697 (1963). <sup>10</sup> W. Fiers, L. Lepoutre, L. Yandendriesse, *Biochemistry*, **13**, 432 (1965).