

Г. А. КОРНЕЕВА, А. Н. ПЕТРОВА

**ИССЛЕДОВАНИЕ РНК ВЕТВЯЩЕГО ФЕРМЕНТА ИЗОМЕРАЗЫ
АМИЛОЗЫ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА
В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 21 VIII 1974)

Как показали наши предыдущие исследования, ветвящийся фермент мышц кролика — изомеразы амилозы (ИА) (α -1,4-глюкан; α -1,4-глюкан-6-глюкозилтрансфераза) содержит вещества нуклеиновой природы, участвующие в процессе ветвления и идентифицированные как низкополимерная РНК (¹), неотделимая от белка при действии ряда факторов: при длительном диализе, подкислении препаратов, обработке их протаминсульфатом, при электрофорезе в аппарате Тизелиуса и, как показали последние исследования, при электрофорезе в полиакриламидном геле (ПАГ) (²).

В данной работе представлены данные по изучению РНК ИА методом электрофореза в ПАГ. При исследовании электрофоретических свойств для сравнения использовали тРНК^{вал} и рРНК 23-16 S *Escherichia coli*.

РНК ИА выделяли фенольной обработкой препаратов ИА (³). От фенола освобождались 3-кратным пересаживанием спиртом и гель-фильтрацией на сефадексе G-25. Дополнительную очистку РНК ИА проводили на ДЭАЭ-целлюлозе; для элюции использовали 0,05 M NaCl, ацетатный буфер с 0,5 M версена и 0,1–1,0 M NaCl. Как показали наши исследования, РНК ИА элюировалась 0,6 M NaCl, а тРНК^{вал} 0,7 M NaCl.

Для приготовления ПАГ применяли в основном методику Ленинга (⁴) с некоторыми более поздними модификациями (⁵). Использовали гели в концентрации 5–14%. Из предварительных опытов нами были выбраны следующие условия для электрофореза: буфер трис-боратный (0,09 M трис+0,0025 M ЭДТА +0,05 M NaCl+борная кислота до pH 7,8), сила тока 2 ма на трубку, время электрофореза 2 часа. Гелевые столбики окрашивали 1% акридиновым оранжевым в 15% уксусной кислоте или 0,2% метиленовым синим в 0,4 M ацетатном буфере с pH 4,5. Маркером движе-

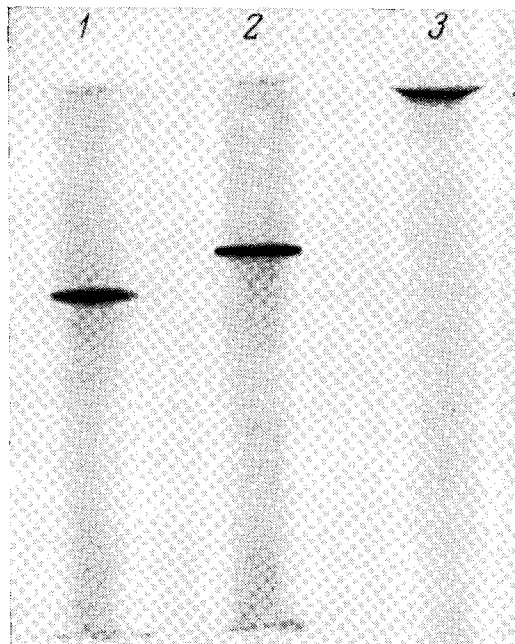


Рис. 1. Электрофорез РНК ИА (1), тРНК^{вал} (2) и рРНК 23-16S (3) *E. coli*. Концентрация геля 8%; условия электрофореза описаны в тексте

ния служил бромфенолблау, который наносили на отдельный гелевый столбик, так как он имел близкую с исследуемыми РНК подвижность. Для оценки молекулярного веса РНК ИА методом электрофореза в ПАГ использовали 3% акриламид — агарозный гель (6). Метчиками служили тРНК^{вал} (Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения Академии наук СССР) и рРНК 23—16 S E. coli (лаборатория белка

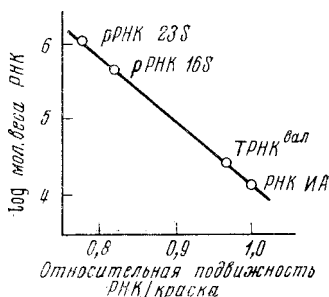


Рис. 2. Калибровочная кривая для определения молекулярного веса РНК ИА. Условия снятия кривой см. в тексте

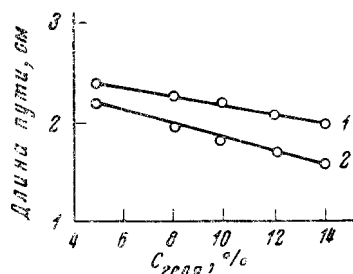


Рис. 3. Электрофорез препаратов РНК ИА (1) и тРНК^{вал} (2) в ПАГ различной концентрации. Условия электрофореза см. в тексте

и нуклеиновых кислот Института биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР). Предварительной денатурации метчиков и РНК ИА не проводили. Для более правильной интерпретации опытов по электрофорезу совместно с Р. С. Шакуловым был определен коэффициент седиментации РНК ИА на аналитической ультрацентрифуге «Спинко Е», оборудованной у.ф. оптикой. РНК ИА (150—200 мкг) растворяли в том же буфере, кото-

рым ее элюировали с ДЭАЭ-целлюлозы, и центрифугировали при скорости 52 640 об/мин при температуре 20° с интервалом съемки 16 мин. Коэффициент седиментации рассчитывали по 6 снимкам, которые денситометрировали на микроденситометре МФ-4.

Исследование электрофоретической подвижности РНК ИА (рис. 1) показало, что препараты гомогенны и что РНК ИА более подвижна, чем тРНК^{вал}. рРНК оставалась на старте как высокополимерный препарат.

Для определения молекулярного веса РНК ИА нами была построена калибровочная кривая (рис. 2). Как видно из рисунка, РНК ИА относится к низкополимерным и имеет молекулярный вес примерно 10 000. Метод ультрацентрифугирования подтвердил эти данные. Исследованный нами препарат оказался гомогенным, и коэффициент седиментации его был равен 2,5S, что совпадает с полученными ранее данными (7). Молекулярный вес РНК ИА, рассчитанный по формуле $M=1550S^{2,1}$ (8), равен примерно 10 000.

Нами была также изучена зависимость электрофоретической подвижности РНК ИА и тРНК^{вал} от концентрации геля (рис. 3). Как видно из рисунка, длина пути препаратов уменьшается прямолинейно с увеличением концентрации геля в исследованной области. Оба препарата в данных условиях опыта идут впереди или вместе с краской-маркером, но РНК ИА более подвижна при всех исследованных концентрациях геля. Исходя из

Таблица 1

Зависимость изменения относительной электрофоретической подвижности f от концентрации геля

Концентрация геля, %	РНК ИА		тРНК ^{вал}	
	f	$\log f \cdot 100$	f	$\log f \cdot 100$
5	1,045	19,1	1,116	47,7
8	1,184	73,4	1,158	63,3
10	1,222	87,1	1,167	67,1
12	1,242	94,1	1,150	60,1
14	1,266	102,8	1,100	41,4

данных, представленных на рис. 3, была рассчитана относительная электрофоретическая подвижность f препаратов РНК (длина пути РНК/длина пути краски) (табл. 1). Как видно из таблицы, f для РНК ИА незначительно увеличивается (прямолинейно при пересчете на $\log f \cdot 100$) с увеличением концентрации геля. Для тРНК^{вал} значения f также близки, но прямолинейной зависимости $\log f \cdot 100$ от концентрации геля не обнаружено. Полученные нами данные о различной зависимости $\log f \cdot 100$ для РНК ИА и тРНК^{вал}, вероятно, можно объяснить их различной структурой. Согласно литературным данным⁽⁹⁾, прямолинейное увеличение $\log f \cdot 100$ в области концентраций геля 5—15% было получено лишь для РНК 4S возбудителя экзокортиса лимона, а для других РНК из этого же объекта было найдено уменьшение данного параметра. Эти авторы считают возможным такой эффект за счет разной структуры исследованных РНК.

Таким образом, выделенная нами РНК ИА является гомогенным низкополимерным препаратом, что было установлено как электрофоретически, так и ультрацентрифугированием. Она имеет коэффициент седиментации 2,5 S, молекулярный вес порядка 10 000 и является более низкополимерной, чем тРНК^{вал}.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
21 VIII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Р. Д. Филиппова, А. Н. Петрова, Биохимия, т. 36, № 6, 1239 (1971). ² А. Н. Петрова, Т. А. Шведова, ДАН, т. 218, № 5 (1974). ³ K. Kirby, Biochem. J., v. 64, 405 (1956). ⁴ U. E. Loening, Biochem. J., v. 102, 251 (1967). ⁵ L. Reijnders, P. Stool et al., Biochim. et biophys. acta, v. 324, 320 (1973). ⁶ Л. П. Наумова, В кн. Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот, «Наука», 1973, стр. 143. ⁷ Р. Д. Филиппова, А. Н. Петрова, ДАН, т. 184, 481 (1969). ⁸ A. S. Spirin, In: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, v. 2, N. Y., 1963, p. 307. ⁹ J. S. Semancik, T. J. Morris, L. G. Weathers, Virology, v. 53, 448 (1973).