

УДК 547.963.3

ГЕНЕТИКА

А. К. ПОПОВ, А. Р. ФЕДОТОВ

ИНФОРМАЦИОННАЯ РНК РЕТИКУЛОЦИТОВ КРОЛИКА, НЕ СВЯЗАННАЯ С РИБОСОМАМИ

(Представлено академиком А. С. Спириным 30 XII 1974)

Из полирибосом ретикулоцитов кролика выделена 9S РНК, содержащая поли-А-богатые последовательности и направляющая в бесклеточной белоксинтезирующей системе синтез α - и β -полипептидных цепей глобина (^{1, 2}). Показано, что рибонуклеопротеидные частицы, содержащие мРНК (информосомы) ретикулоцитов кролика, содержат РНК, кодирующую только α -цепь глобина (^{1, 3}).

Целью настоящей работы было выделение из ретикулоцитов препаративных количеств мРНК, кодирующей α -цепь глобина и исследование продуктов трансляции этой РНК.

Выделение клеток, лизис и получение постмитохондриальной надосадочной жидкости проводили, как описано ранее (⁴). Для концентрации рибонуклеопротеидного материала применяли процедуру осаждения при pH 5,1 (⁵). Для этого к постмитохондриальной надосадочной жидкости на холоду добавляли по каплям 1 M уксусную кислоту. Выпавший осадок тотчас же отделяли центрифугированием (10 000 g, 5 мин., 4°), растворяли в 0,1 M трис-HCl, pH 8,0, 0,05 M KCl, 0,005 M MgCl₂ и раствор осветляли при том же режиме центрифугирования. Гемоглобин, сорбированный на осадке, отделяли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-100 (1,6×70 см), уравновешенной 0,01 M трис-HCl, pH 7,4, 0,02 M KCl, 0,0015 M MgCl₂. Фракции, соответствующие свободному объему колонки, собирали и вновь концентрировали при pH 5,1, как описано выше. Материал наслаивали на градиент концентрации сахарозы и подвергали центрифугированию (рис. 1). Результаты регистрировали измерением оптической плотности при 260 нм. В зоне, седиментирующей со скоростью приблизительно 20S (16S–24S) относительно 40S рибосомной субчастицы, наблюдали небольшой четко воспроизводимый пик. Фракции, соответствующие этому пику, как показано на рис. 1, собирали и использовали для выделения и анализа РНК.

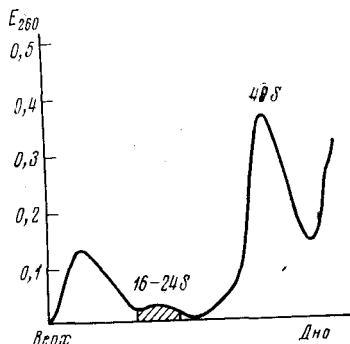


Рис. 1. Центрифугирование рибонуклеопротеидного материала ретикулоцитов кролика. Ультрацентрифуга «Spinco» L-2-65B, ротор SW 25,2; 7–25% линейный градиент сахарозы на буфере 0,01 M трис-HCl pH 7,4, 0,02 M KCl, 0,0015 M MgCl₂; 13 час., 24 000 об/мин., 4°

Для этого материал осаждали добавлением 2,5 объемов этанола, содержащего 0,1 M NaCl, и оставляли на ночь при –20°. Осадок отделяли центрифугированием (5000 g, 10 мин., 4°), растворяли в 0,01 M трис-HCl, pH 7,4, 0,1 M NaCl, 0,001 M ЭДТА и подвергали кратковременной инкубации с 0,5% додецилсульфатом натрия (5 мин., 37°). РНК исследовали в градиенте концентрации сахарозы (рис. 2). При центрифугировании в течение 6 час. наблюдали пик 9S относительно 4S, 9S, 18S РНК из ре-

тикулоцитов кролика, в то время как в зоне, соответствующей 18S, не было сколько-нибудь заметных количеств РНК (рис. 2а). Это свидетельствует о том, что препарат, использованный для выделения РНК, не содержал примесей рибосомного материала. При более длительном центрифугировании в пике 9S обнаруживается плечо, соответствующее приблизительно 7S. РНК с такой константой седиментации была описана в пострибосомной надосадочной жидкости ретикулоцитов кролика (³).

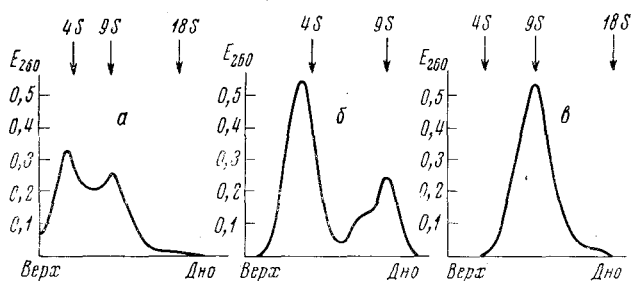


Рис. 2. Центрифугирование РНК зоны 16S—24S. а — РНК, полученная инкубацией материала 16S—24S зоны с 0,5% додецилсульфатом натрия; центрифугирование 6 час.; б — то же, что и а; центрифугирование 10 час.; в — РНК из материала 16S—24S зоны, сорбирующаяся на поли-У-целлюлозной колонке. Ультрацентрифуга «Spinco» L-2-65B, ротор SW 65, 49000 об/мин, 4°; 5—20% линейный градиент сахарозы на буфере 0,01 M трис-HCl pH 7,4, 0,1 M NaCl, 0,001 M ЭДТА

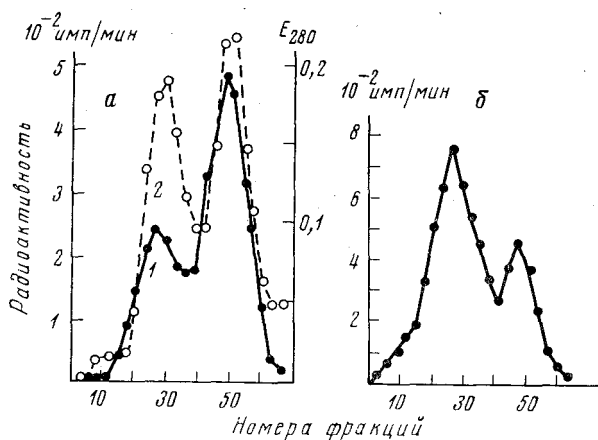


Рис. 3. Хроматография на КМ-целлюлозной колонке продуктов синтеза в бесклеточной системе. Левый пик соответствует α -цепи. а — при добавлении 9S РНК из полирибосом; б — при добавлении 9S РНК из пострибосомной надосадочной жидкости. 1 — радиоактивность, 2 — E_{280}

Для выделения РНК применяли также поли-У-целлюлозную колонку (0,8×2,0 см). Материал из зоны 16S—24S (рис. 1) инкубировали на холоду с 1% лаурил-саркозинатом натрия (⁶), затем разводили в 5 раз 0,01 M трис-HCl, pH 7,4, 0,03 M ЭДТА, доводили концентрацию NaCl до 0,1 M и пропускали через колонку при 4°. Колонку промывали 10—15-кратным объемом того же буфера. Элюцию проводили при 25° бидистиллированной водой. Для уменьшения неспецифической сорбции 7S РНК к исходному материалу добавляли 1 мг 18S РНК, не сорбирующейся на колонке (⁷). Профиль седиментации РНК, сорбированной на колонке, представлен на

рис. 2в. Эта РНК состоит из 9S материала, при собирании которого небольшая примесь 18S РНК легко удалялась.

Для тестирования мРНК в бесклеточной системе трансляции РНК выделяли из 16S–24S зоны депротеинизацией смесью фенол — хлороформ при pH 9,0 ⁽⁸⁾. Получение мРНК из полирибосом ретикулоцитов кролика и бесклеточная белоксинтезирующая система описаны в предыдущей работе ⁽⁴⁾*. Анализ продуктов трансляции проводили методом хроматографии на КМ-целлюлозной колонке ⁽⁹⁾ с небольшими модификациями. Немеченый глобин получали из эритроцитов кролика ⁽⁹⁾.

Как следует из рис. 3а, 9S РНК из полирибосом направляет синтез как α -, так и β -полипептидных цепей глобина. 9S РНК из пострибосомной надосадочной жидкости направляет в основном синтез α -полипептидной цепи глобина (рис. 3б), однако мы обнаружили небольшой, но достоверный синтез β -цепи. Соотношение информационных РНК для синтеза каждой из этих полипептидных цепей не может быть корректно оценено по соотношению продуктов трансляции, так как в бесклеточной системе, использованной нами, происходит, по-видимому, синтез преимущественно β -цепи (рис. 3а).

Авторы выражают благодарность Г. А. Дворкину за постоянный интерес к работе и ценные замечания.

Институт общей генетики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
2 XII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Jacobs-Lorena, C. Baglioni, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 69, 1425 (1972).
² L. Lim, E. S. Canellakis, Nature, v. 227, 740 (1970). ³ A. M. Gianni, B. Giglioni et al., Nature New Biol., v. 240, 183 (1972). ⁴ А. Р. Понов, А. Р. Федотов и др., Биохимия, т. 40, в. 2 (1975). ⁵ T. Hunt, T. Hunter, A. Munro, J. Mol. Biol., v. 36, 31 (1968).
⁶ U. Lindberg, T. Persson, Europ. J. Biochem., v. 31, 246 (1972). ⁷ А. Р. Понов, А. Р. Федотов, Г. А. Дворкин, Биохимия, т. 40, в. 1, 45 (1975). ⁸ H. Aviv, P. Leder, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 69, 1408 (1972). ⁹ G. Schapira, J. Rossa et al., Methods in Enzymology, v. 42B, 747 (1968).

* Эксперименты по трансляции мРНК в бесклеточной системе проводились в Межфакультетской лаборатории биоорганической химии МГУ Т. Ю. Угаровой и Ю. В. Свиткиным, которым авторы выражают глубокую благодарность.