

В. З. ТАРАНТУЛ, В. А. ЛИНАСОВА, К. Г. ГАЗАРЯН

**ВЫДЕЛЕНИЕ ФРАГМЕНТОВ ДНК ГОЛУБЯ, СОДЕРЖАЩИХ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ, КОМПЛЕМЕНТАРНЫЕ
ГЛОБИНОВОЙ мРНК**

(Представлено академиком А. А. Баевым 8 X 1975)

В настоящее время из ДНК эукариотов в достаточно очищенном виде выделены гены, кодирующие синтез рРНК (^{1, 2}), тРНК (^{3, 4}), 5S РНК (⁴) и гистоновой мРНК (⁵). В этих работах использовано главным образом два вида процедур: изопикническое центрифугирование в градиенте плотности солей цезия и гибридизация тотальной ДНК с индивидуальной РНК с последующим отделением гибридов на гидроксипатите. Во всех случаях выделялись гены, которые многократно повторены в геноме, и пока нет работ по изоляции генов, представленных в геноме немногочисленными копиями. Выделение уникальных генов представляет собой значительно более сложную в методическом отношении задачу, требующую разработки новых подходов.

В настоящем сообщении приводятся данные по изоляции из генома голубя фрагментов ДНК, содержащих последовательности, комплементарные глобиновым мРНК. Эти последовательности, по существующим сведениям, представлены в геноме немногочисленными копиями (⁶). Выделение основано на связывании поли(А)-последовательностей гибридов глобиновой мРНК — ДНК с поли(У), пришитой к сефарозе.

Глобиновую мРНК выделяли из полисом ретикулоцитов голубя (⁷) с использованием поли(У)-сефарозы, приготовленной по Вагнеру и др. (⁸).

ДНК выделяли из ретикулоцитов голубя и фрагментировали до размеров 500 нуклеотидных пар путем трехкратного продавливания через пресс, как описано ранее (⁹).

Очистку ДНК от фрагментов, содержащих поли- и олиго(дА)- и поли- и олиго(дТ)-последовательности, осуществляли следующим образом. 1) ДНК (~6 мг/мл в 0,01 М фосфатном буфере) денатурировали 10 мин. в кипящей бане, охлаждали до 60° и довели концентрацию фосфатного буфера до 0,14 М. Затем ДНК инкубировали 3 мин. при 60° и 1 час при 23°. Ренатурированную (25—30%) фракцию отделяли на гидроксипатите при 45° и отбрасывали. 2) Фракцию ДНК, элюируемую с гидроксипатита 0,14 М фосфатным буфером, переводили в буфер А (0,01 М трис-НСl, рН 7,5, 0,2% SDS), затем смешивали при 65° с целлюлозой с пришитой к ней ультрафиолетом поли(А) (¹⁰) и добавляли NaCl до конечной концентрации 0,1 М (буфер Б). Суспензию перемешивали в течение 1 часа при 23°. Связавшуюся и несвязавшуюся с поли(А)-целлюлозой фракции разделяли путем последовательной элюции буферами Б и А. 3) Несвязавшийся материал переводили в буфер А, после чего повторяли процедуру, описанную в пункте 2), но с использованием поли(У)-сефарозы.

Гибридизацию очищенной ДНК с глобиновой мРНК проводили в 0,4 М NaCl — 0,01 М трис-НСl, рН 7,5, 0,2% SDS. ДНК денатурировали в буфере А и смешивали при 67° с мРНК в соотношении 1000 : 1. Затем концентрацию NaCl довели до 0,4 М. После отжига до $C_0t=150$ моль·сек/л (по ДНК) пробу смешивали с 5 мл поли(У)-сефарозы и перемешивали

1 час при 23°. Несгибризовавшуюся ДНК последовательно элюировали буферами Б и А при той же температуре (23°). Гибриды и свободную мРНК элюировали буфером А при 55°, осаждали спиртом и обрабатывали щелочью (¹¹). Полученный препарат ДНК после нейтрализации вновь осаждали спиртом в присутствии 40 мкг РНК E. coli.

Для тестирования наличия в выделенных фрагментах ДНК последовательностей, комплементарных глобиновой мРНК, использовали высокоэффективную по гуанину (1200 имп/мин · пшкормоль) анти-кДНК. Известно, что

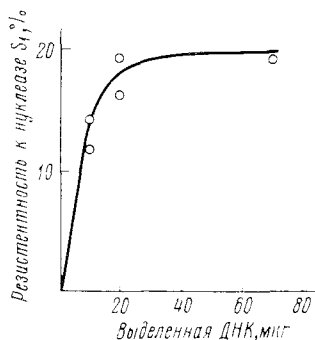


Рис. 1 Гибридизация анти-кДНК с выделенными фрагментами ДНК. Отжиг проводили в 20 мкл 0,24 M фосфатного буфера, pH 6,8 с 0,1% SDS 2 часа при 67° и 1 час при 60°. Анти-кДНК во всех пробах 10⁻³ мкг. После отжига пробы обрабатывали нуклеазой S₁ (¹⁴). Из результатов вычитена резистентность к нуклеазе S₁ анти-кДНК в контрольных пробах, содержащих такое же количество тотальной ДНК

около 40% материала, синтезируемого при обратной транскрипции мРНК, представлено цепями, комплементарными первичному ДНК-продукту (кДНК) (¹²). Продукт, содержащий смесь кДНК и анти-кДНК синтезирован и очищен в Институте молекулярной биологии АН СССР Л. Ю. Фроловой и Л. Л. Киселевым в ревертазной системе без актиномина (¹⁴) с использованием в качестве матрицы мРНК глобина голубя. Для отделения нитей анти-кДНК от кДНК суммарный продукт пропускали через колонку с сефадексом G×75 (1,2×70 см), уравновешенным 0,1 M NH₄HCO₃, pH 8,2, и гибридизовали с 500-кратным избытком глобиновой мРНК в 0,24 M фосфатном буфере, содержащем 0,2% SDS, в течение 2 час. при 67°. Затем концентрацию фосфатного буфера снижали до 0,12 M и гибриды отделяли от свободной ДНК на колонке с гидроксипатитом при 72° (¹³). 14% меченого материала было получено во фракции, элюируемой 0,12 M фосфатным буфером. При повторном отжиге этой фракции с избытком мРНК в гибриды входило <3% меченого материала. Полученный препарат (анти-кДНК) обрабатывали щелочью для освобождения от мРНК, нейтрализовали и осаждали спиртом с добавлением РНК E. coli (50 мкг на 50 000 имп/мин анти-кДНК) в качестве носителя.

На рис. 1 приведены результаты двух опытов по гибридизации анти-кДНК с выделенными фрагментами ДНК. Видно, что имеет место достоверное и специфическое увеличение резистентности анти-кДНК к нуклеазе S₁. В этих опытах нельзя было ожидать высоких процентов гибридизации анти-кДНК, так как во многих фрагментах выделенной ДНК из-за случайного их дробления должна быть представлена только часть глобиновых последовательностей. Соответствующие участки молекул анти-кДНК, вошедших в гибриды, остаются свободными и будут гидролизированы нуклеазой. Кроме того, возможно, что часть цепей анти-кДНК не способна образовывать стабильные гибриды в использованных условиях отжига (короткие фрагменты с низким ГЦ-составом, фрагменты, содержащие ошибки транскрипции и т. д.).

Если принять, что α- и β-глобиновые гены повторяются по 5 раз на геном (⁶), то из 100 мг суммарной ДНК порядка 0,2 мкг приходится на эти последовательности. Из 100 мг ДНК, использованной в каждом опыте, было получено ~100 мкг материала, в котором содержались глобиновые последовательности. При гибридизации с 20 мкг этой ДНК ~20% анти-кДНК входило в гибриды (см. рис. 1). Для обеспечения полноты реакции

в используемых условиях гибридизации требуется примерно 10-кратный избыток одного из компонентов (по аналогии с гибридизацией мРНК и кДНК (¹³)), в данном случае изолированных глобиновых последовательностей ДНК. Исходя из этого, мы оцениваем выход глобиновых последовательностей равным ~0,05 мкг из 100 мг тотальной ДНК, что составляет $\frac{1}{3}$ часть от расчетного их количества в геноме. Более точные оценки выхода глобиновых последовательностей и их характеристика являются задачей дальнейшей работы.

Авторы приносят благодарность Л. Ю. Фроловой и Л. Л. Киселеву за предоставление препарата комплементарной ДНК и В. Н. Незавибатько за приготовление поли(У)-сефарозы.

Институт атомной энергии
им. И. В. Курчатова
Москва

Поступило
26 IX 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ F. Birnstiel, J. Speirs et al., *Nature*, v. 219, 454 (1968).
- ² S. K. Chattopadhyay, D. E. Kohne, S. K. Dutta, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 69, 3256 (1972).
- ³ R. Ray, S. K. Dutta, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 47, 1458 (1972).
- ⁴ B. P. Doctor, D. J. Brenner, W. L. Miller, *Methods in Enzymology*, v. 29, 419 (1974).
- ⁵ M. Birnstiel, J. Telford et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 71, 2900 (1974).
- ⁶ J. O. Bishop, R. Pemberton, C. Baglioni, *Nature New-Biol.*, v. 235, 231 (1972).
- ⁷ K. G. Gasaryan, V. Z. Tarantula et al., *Nucleic Acid Res.*, v. 2, 1203 (1975).
- ⁸ A. F. Wagner, R. L. Bugianesi, T. Y. Shen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 45, 184 (1971).
- ⁹ В. З. Тарантул, Ю. Н. Баранов и др., *Мол. биол.*, т. 7, 849 (1973).
- ¹⁰ R. Sheldon, C. Jurale, J. Kates, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 69, 417 (1972).
- ¹¹ Л. Л. Киселев, Л. Ю. Фролова и др., *ДАН*, т. 213, 1203 (1973).
- ¹² J. P. McDonnell, A. Garpin et al., *Nature*, v. 228, 433 (1970).
- ¹³ К. Г. Газарян, В. З. Тарантул и др., *ДАН*, т. 216, 216 (1974).
- ¹⁴ W. D. Sul-ton, *Biochim. et biophys. acta*, v. 240, 522 (1971).