

УДК 577.15

БИОХИМИЯ

Л. Ю. ФРОЛОВА, Я. МЕЛДРАЙС, Л. Л. КИСЕЛЕВ

**РНК-НАПРАВЛЯЕМЫЙ СИНТЕЗ ДНК IN VITRO:
ОБНАРУЖЕНИЕ ПОЛИДЕЗОКСИАДЕНИЛАТА В ДНК,
КОМПЛЕМЕНТАРНОЙ АНТИМЕССЕНДЖЕР-ДНК**

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 25 VIII 1975)

При синтезе ДНК по матрице РНК, катализируемом РНК-направляемой ДНК-полимеразой (ревертазой), образуются две нити, одна из которых (кДНК) комплементарна РНК, служившей матрицей, тогда как вторая нить (анти-кДНК) комплементарна нити кДНК (образы см. (1, 2)). При размножении РНК-содержащих опухолеродных вирусов *in vivo* синтезируется двуспиральная ДНК, встраивающаяся затем в геном клетки. При синтезе ДНК *in vitro* с помощью высокоочищенных ревертаз главное внимание уделяли характеристике кДНК, полученной в присутствии актиномина D, ингибирующего синтез второй нити ДНК, так как кДНК в дальнейшем широко использовали в опытах молекулярной гибридизации. Что касается анти-кДНК, то, помимо самого факта синтеза, нам не удалось найти в литературе каких-либо структурных характеристик этой нити.

В данной работе нами была поставлена задача охарактеризовать молекулы анти-кДНК по длине и изучить структуру 3'-конца.

Выделение ревертазы из очищенного вируса птичьего миеобластома по условиям синтеза ДНК описаны (3). В качестве матрицы использовали мРНК глобина кролика, характеристики которой приведены ранее (4). Синтез (¹⁴C)поли(дТ) вели с помощью ревертазы, как описано (3). Реактивы и материалы те же, что и в предыдущих работах (3, 4).

Принципиальная схема опыта состояла в следующем. Сначала проводили синтез ДНК (в отсутствие актиномина D) по матрице глобиновой мРНК с использованием олиго(дТ)-затравки. Полученную ДНК после очистки подвергали отжигу с глобиновой мРНК, взятой в избытке. Нити кДНК, комплементарные мРНК, давали при этом двуспиральный молекулярный мРНК-кДНК-гибрид, тогда как нити анти-кДНК в гибридизацию не вступали. Возможность значительного образования ДНК-ДНК-гибридов предотвращали большим избытком мРНК. Смесь однотяжевых анти-кДНК отделяли от РНК-ДНК- и ДНК-ДНК-гибридов фракционированием на оксиапатите. Выделенную анти-кДНК подвергали электрофорезу в денатурирующих условиях для оценки длины молекулы.

Методические подробности приводятся ниже. Гибридизацию мРНК с ДНК вели в 0,2 мл раствора, содержащего 40% формамид, 0,3 М NaCl, 0,03 М цитрат Na, pH 7,0, 0,1% додецилсульфат Na, 75 мкг/мл мРНК и 1,0 мкг/мл [³H]дЦМФ-ДНК. Смесь нагревали до 67° и затем медленно, в течение 12 час., охлаждали до 25°. Инкубационную смесь после гибридизации разводили 0,01 М фосфатным буфером, pH 6,8 (ФБ) и раствор наносили на колонку с оксиапатитом объемом 2 мл, приготовленным по методу (5). Колонку промывали последовательно 3 объемами 0,01, 0,16 и 0,4 М ФБ. Все операции проводили при 60°. Фракции [³H]ДНК, элюирующиеся 0,16 М и 0,4 М ФБ, упаривали на ротационном испарителе, растворяли в воде, пропускали через колонку с сефадексом G-10, уравнированную буфером, содержащим 0,1 М NaCl, 0,1% додецилсульфат Na,

0,01 М ЭДТА, 0,05 М трис-НСl, рН 7,5. Высокмолекулярную фракцию осаждали спиртом в присутствии РНК-носителя. Осадки растворяли в 0,3 N КОН, прогревали 15 мин. при 90°, раствор быстро охлаждали и нейтрализовали HCl до рН 6–7.

Фракция ДНК, элюируемая с колонки с оксиапатитом 0,16 М ФБ, была подвергнута электрофорезу в 2,5% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях при 60° в 8 М мочеvine (6). Электрофорез 1 час при токе 5 ма на гель; буфер: 8 М мочеvина, 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 2 мМ ЭДТА, 60°. Цилиндры геля разрезали на фракции шириной 1 мм, обрабатывали

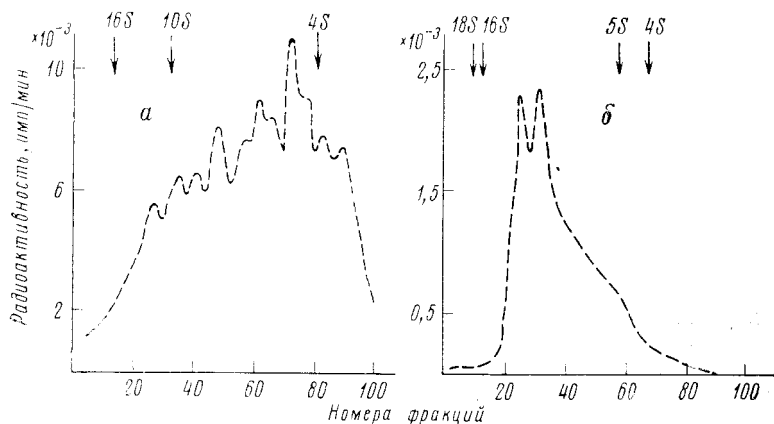
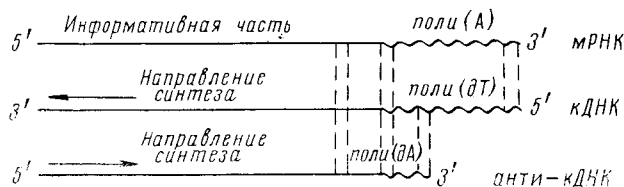


Рис. 1. Электрофорез в трубках в денатурирующих условиях анти-кДНК (а) и кДНК (б), синтезированных по матрице глобиновой мРНК

2 М аммиаком (0,5 мл, 40°, 15 час) и просчитывали в 10 мл диоксанового сцинтиллятора на счетчике «Intertechnique» SL30. В качестве свидетелей использовали мРНК глобина кролика и тРНК дрожжей. Сравнивали длину анти-кДНК с кДНК, полученной в присутствии актиномицина D. Из рис. 1 видно, что анти-кДНК гетерогенна и занимает широкую полосу от 9 S до 3,5 S с максимумом около 5 S. Препарат кДНК значительно более однороднее по молекулярному весу, причем два максимума сдвинуты в область 8–9 S. Из сравнения рис. 1а и 1б следует заключить, что нити кДНК, синтезированные по мРНК, в среднем значительно превосходят по длине нити анти-кДНК, синтез которых, как предполагают (7, 8), происходит по мРНК-кДНК-гибриду или по кДНК. Однако и во фракции анти-кДНК присутствует некоторая доля молекул, которая соответствует по длине мРНК и кДНК. Можно думать, что это полные транскрипты.

Для проверки этого предположения мы продолжили анализ анти-кДНК, воспользовавшись тем, что на 5'-конце кДНК, как было показано ранее (4, 9), имеется полиимидиловая последовательность. Идея опыта ясна из приводимой ниже схемы:



Если синтез второй нити ДНК происходит с полным копированием кДНК, то во фракции анти-кДНК должны обнаруживаться поли(дА)-последовательности, комплементарные поли(дТ)-фрагменту кДНК. Если же синтез заканчивается раньше, в информативной области молекулы, то

ожидать появления поли(дА)-последовательностей в анти-кДНК нет оснований. Для обнаружения поли(дА) в составе анти-кДНК мы применили прием, широко используемый сейчас при выделении мРНК, а именно, извлечение на поли(У)-содержащую колонку тех молекул, которые дают комплементарные комплексы благодаря присутствию поли(дА) в их составе.

На колонку с поли(У)-сефарозой, уравновешенную 0,4 М NaCl на буфере А, содержащем 0,02 М ЭДТА, 0,25% додецилсульфат Na, 0,01 М трис-HCl, pH 7,0, наносили при 25° фракцию анти-кДНК, полученную

Таблица 1

Фракция [³ H]ДНК	Радиоактивность	
	имп/ мин × 10 ⁻³	%
Нанесено на поли(У)-сефарозу	84	100
Элюировано 0,4 М NaCl+буфер А	56	67
Элюировано буфером А при 25°	10	12
Элюировано буфером А при 55°	7	8
Выход по радиоактивности	73	87

Таблица 2

Гибридизация	Нуклеаза S ₁			
	до гидролиза, имп/мин · 10 ⁻³	после гидролиза, имп/мин · 10 ⁻³		%
Контроли				
[¹⁴ C]поли(дТ) — поли(рА)	36	33		92
[¹⁴ C]поли(дТ) — самоотжиг	74	6,5		8
Опыт				
[³ H]ДНК — [¹⁴ C]поли(дТ)	30	9,4		31

элюцией 0,16 М ФБ с колонки с оксиапатитом. Затем колонку (объем 2 мл) промывали последовательно 6 мл 0,4 М NaCl на буфере А, 6 мл буфера А, затем температуру поднимали от 25 до 55° и снова промывали 6 мл буфера А. Распределение радиоактивности [³H]ДНК приведено в табл. 1 (аликвоты просчитывали в сцинтиляторе на базе диоксана).

Из представленных данных следует, что 20% анти-кДНК элюируется при сниженной ионной силе и повышенной температуре, что свидетельствует о присутствии в этой фракции [³H]ДНК последовательностей поли(дА). Следует подчеркнуть, что найденное значение является заниженным, так как возврат радиоактивности с колонки был не полным (при расчете от элюированной радиоактивности поли(дА)-содержащие фракции составляют 23%) и, кроме того, метод не позволяет уловить очень короткие поли(дА)-фрагменты, не сорбирующиеся при 25°. Следовательно, в составе анти-кДНК 20–25% молекул содержит поли(дА)-последовательности. Если это так, то при гибридизации анти-кДНК с поли(дТ) должны быть обнаружены гибриды, устойчивые к действию S₁-нуклеазы, гидролизующей однотяжевые участки. Гибридизацию вели в объеме 0,1 мл в 0,01 М трис-HCl, pH 7,5, 0,1% додецилсульфате Na и 0,4 М NaCl, 0,06 мкг [³H]анти-кДНК и 0,0025 мкг [¹⁴C]поли(дТ). Смесь нагревали до 50° и затем медленно охлаждали до 25°. Полученные гибриды обрабатывали нуклеазой S₁, как описано (4), и радиоактивность, осаждаемую холодной трихлоруксусной кислотой, просчитывали по [¹⁴C]-каналу.

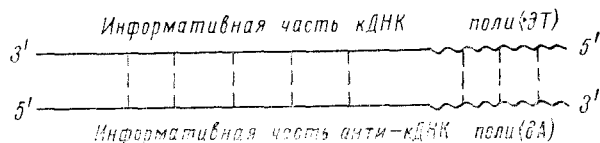
Результаты этого опыта приведены в табл. 2.

Из этих данных ясно видно, что анти-кДНК защищает поли(дТ) от переваривания нуклеазой S₁, что подтверждает присутствие поли(дА) последовательностей в анти-кДНК.

Таким образом, на основании трех независимых способов исследования — определения длины цепей, сорбируемости на поли(У)-колонках и защитного действия анти-кДНК при гидролизе нуклеазой S₁ поли(дТ) — можно сделать вывод, что часть молекул анти-кДНК (в используемых

нами условиях синтеза не менее $1/5—1/4$) представляют собой полные транскрипты, содержащие поли(дА)-последовательности на 3'-конце. Другая часть молекул анти-кДНК представляет собой, скорее всего, неполные транскрипты, синтез которых по неизвестным причинам останавливается в ходе комплементарного копирования информативной области кДНК, не достигая гомополимерного участка.

Суммируя данные этой и предшествующей ⁽¹⁾ работ, мы можем предложить следующую схему структуры ДНК, синтезируемой ревертазой *in vitro* по матрице глобина кролика:



Следует сделать два замечания. Не все молекулы ДНК, синтезированные по глобиновой мРНК *in vitro* с помощью высокоочищенной ревертазы, имеют указанную структуру — часть представляет собой неполные транскрипты. Из приведенных данных нельзя оценить длины поли(дА)-последовательностей, содержащихся в анти-кДНК, однако можно предполагать, исходя из гетерогенности поли(дТ) в составе кДНК, что поли(дА) также содержат статистический набор длин.

Помимо демонстрации возможности получения полноценной анти-кДНК (по крайней мере по длине цепей), обнаружение поли(дА)-последовательностей дает удобный и простой метод выделения полных транскриптов анти-кДНК из сложной смеси при использовании аффинной хроматографии, что будет сообщено нами отдельно.

Авторы приносят благодарность участникам проекта «Ревертаза», в рамках которого выполнена эта работа, докторам Ч. Кутелю и Э. Розенталю (Центральный институт молекулярной биологии АН ГДР, Берлин-Бух), любезно предоставившим в наше распоряжение препарат мРНК глобина кролика, и доктору Н. А. Граевской, снабдившей нас плазмой цыплят, содержащей вирус миелобластома. Приносим нашу благодарность А. В. Теннову, участвовавшему в анализе препарата кДНК.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
25 VII 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Green, G. Gerard, Progr. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol., v. 14, 187 (1974).
- ² Л. Л. Киселев, Журн. Всесоюз. хим. общ. им. Д. И. Менделеева, т. 20, № 3, 288 (1975).
- ³ Л. Л. Киселев, Л. Ю. Фролова и др., ДАН, т. 243, 1203 (1973).
- ⁴ K. G. Gasaryan, V. Z. Tarantul et al., Nucl. Acid. Res., v. 2, 1203 (1975).
- ⁵ O. Levin, Methods in Enzymology, v. 5, 27 (1962).
- ⁶ L. Reijnders, P. Sloof et al., Biochim. et biophys. acta, v. 324, 320 (1973).
- ⁷ S. Mizutani, D. Boettiger, H. M. Temin, Nature, v. 228, 424 (1970).
- ⁸ G. P. McDonnell, A. C. Garapin et al., Nature, v. 228, 433 (1970).
- ⁹ К. Г. Газарян, В. З. Тарантул и др., ДАН, т. 216, 216 (1974).