

Г. Ф. НЕСТЕРОВА, Я. О. СООМ, А. П. ПЕРЕВОЩИКОВ

ДВУНИТЕВАЯ РНК ГОМОТАЛЛИЧНЫХ САХАРОМИЦЕТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИМИ ДЕТЕРМИНАНТАМИ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

(Представлено академиком Е. М. Крепом 15 IX 1975)

Двунитевая РНК была обнаружена у штаммов-киллеров *K Saccharomyces cerevisiae* в 1972 г. ⁽¹⁾, однако ее связь с цитоплазматическим детерминантом убивающей активности [k] не выяснена окончательно. Ранее нами были получены данные о переносе убивающей активности в штаммы S при инкубации прорастающих спор S вместе с одной из фракций клеточного содержимого штаммов K ⁽²⁾. Для выяснения связи двунитевой РНК с фактором, содержащимся в этой фракции и проникающим в клетки реципиентного штамма, в настоящей работе изучено содержание двунитевой РНК в донорном и реципиентном штаммах.

Использовали гомоталличные штаммы *S. cerevisiae* М-437-2, 768₁-15, 768₁-27 и производные 768₁-15 (табл. 1). Все штаммы содержали доминант-

Таблица 1

Происхождение и генотип использованных гомоталличных штаммов
Saccharomyces cerevisiae

Штамм	Фенотип	Генотип	Происхождение
М-437-2	K	ade _x /ade _x [k]	При у.-ф. облучении спор М-437 (Магарач) ⁽⁴⁾
768 ₁ -15	S	his _y /his _y [o]	⁽⁴⁾
768 ₁ -27	S	lys _x /lys _x [o]	⁽⁴⁾
1-768 ₁ -15	K	his _y /his _y [k]	⁽⁴⁾
1-1-768 ₁ -15	K ^{ts}	his _y /his _y [k ^{ts}]	Клон 1-768 ₁ -15
2-1-768 ₁ -15	N	his _y /his _y [n]	То же
K34	K ^{ts}	his _y /++/lys _x [k ^{ts}]	Гибрид 1-1-768 ₁ -15×768 ₁ -27
K35	N	his _y /++/lys _x [n]	Гибрид 2-1-768 ₁ -15×768 ₁ -27
K36	K	his _y /++/ade _x [k]	Гибрид 1-1-768 ₁ -15×М-437-2
K37	K	his _y /++/ade _x [k]	Гибрид 2-1-768 ₁ -15×М-437-2

Примечание. ade_x his_y lys_x -- мутации, приводящие к потребности соответственно в аденине, гистидине, лизине; [o] — отсутствие цитоплазматического детерминанта антагонистической активности.

ную аллель гена МММ₁, обеспечивающую сохранение в цитоплазме детерминанта [k]. 5–10 г сырой биомассы дрожжей раздавливали хьюз-прессом. Тотальные нуклеиновые кислоты (н.к.) выделяли фенольнодетергентным методом при pH фенола 8,0. Экстрагирующий раствор (э.р.) содержал 1% ЭДТА и 1% додецилсульфата натрия (SDS) pH 8,0. Цитоплазматическую РНК извлекали тем же методом при pH 6,0. Э.р. содержал 0,14 M NaCl, 0,05 M трис-HCl. Впоследствии добавляли SDS до 0,5%. Для изоляции двунитевой РНК раствор н.к. (1 мг/мл в 0,1 M NaCl, 0,01 M трис-HCl, pH 7,8) подвергали обработке панкреатическими РНКазой и ДНКазой (40 и 10 мкг/мл соответственно) 2 часа при 31°, а затем двукратной депротенизации фенольнодетергентным методом. 1 мл раствора, содержащего 1 мг/мл н.к. в 0,14 M NaCl, наносили на колонку сефадекса G-200, уравни-

вешенную 0,14 M NaCl. При гель-фильтрации в том же растворе н.к. с более высоким молекулярным весом выходили в первом пике и исследовались электрофорезом в 2,5% полиакриламидном геле (ПАГ) по методу Дингмана и Пиккока (3) до и после денатурации.

Н.к. штамма М-437-2 разделены электрофорезом на фракции с различным молекулярным весом. Аналогичному электрофорезу был подвергнут образец тех же н.к., обработанный РНКазой и ДНКазой. Фракция ДНК определена на электрофореграмме по специфической окраске по Фэльтгену. ДНК мигрировала наиболее медленно. Остальные фракции, идентифицированные метиленовым синим, не окрашивались по Фэльтгену и, следовательно,

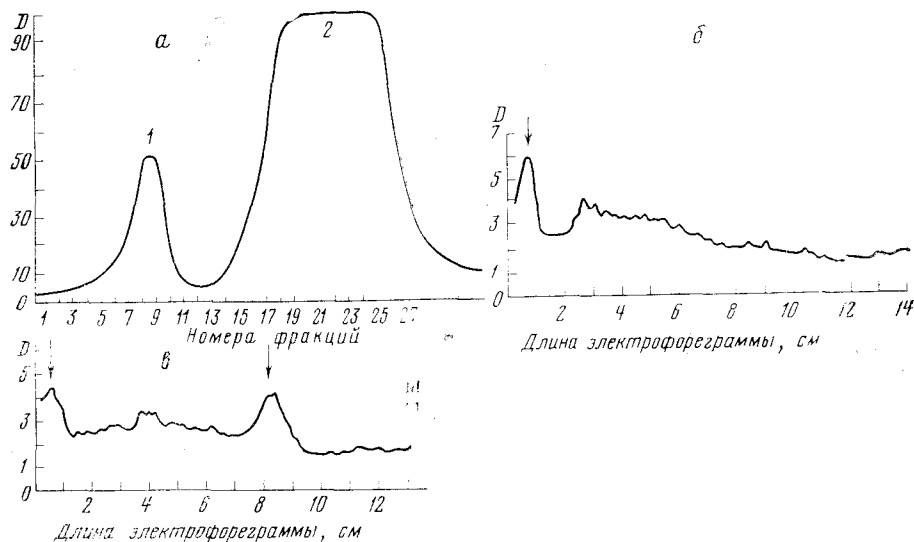


Рис. 1. Идентификация двунитевой РНК штамма М-437-2. а — результаты гель-хроматографии на сефадексе G-200 тотальных пучковидных кислот, обработанных панкреатическими рибонуклеазой и дезоксирибонуклеазой. Пик 1 — РНК, устойчивая к действию РНКазы (ДНК в этом пике отсутствует по данным реакции с дифениламином). Пик 2 — низкомолекулярные РНК и ДНК. б — денситограмма электрофореграммы РНК, взятой из пика 1 гель-хроматографического профиля, полученная после электрофореза в ПАГ; окрашивание метиленовым синим. Стрелка — место, соответствующее локализации «фракции х» на электрофореграмме н.к., выделенных из клеток М-437-2. в — денситограмма электрофореграммы той же РНК, денатурированной прогреванием. Стрелка — местоположение денатурированной РНК, пунктирная стрелка — местоположение нативной РНК

но, представляли собой РНК. Фракции, соответствующие рибосомальным транспортным РНК, определены коэлектрофорезом их со стандартными РНК. В непосредственной близости от ДНК была обнаружена узкая полоса РНК, которая получила наименование «фракции х» (рис. 1а). Эта РНК сохранила свое положение и интенсивность окраски на электрофореграмме после обработки обоими ферментами, которая приводила к исчезновению остальных фракций н.к. и появлению широкой полосы н.к. в области, соответствующей расположению низкомолекулярного материала.

Для изоляции «фракции х» препарат н.к., обработанных ферментами, разделяли на сефадексе G-200. Были выведены два пика н.к. Первый, высокомолекулярный, относительно узкий пик (рис. 2а), не содержал ДНК согласно результатам цветной реакции с дифениламином (4). Второй широкий пик представлял, по-видимому, продукты деградации ДНК и РНК. На электрофореграмме высокомолекулярного материала в качестве основного компонента выделялась фракция, соответствующая по подвижности «фракции х» препарата тотальных н.к. Таким образом, «фракция х» по данным окраски по Фэльтгену и отсутствию реакции с дифениламином представляет собой РНК; по электрофоретической подвижности и скорости

элюции с сефадекса — высокомолекулярную РНК; по способности к денатурации и устойчивости к ферментам — двунитовую РНК. Не исключено, что эта РНК — простой коллинеарный дуплекс, поскольку после ее денатурации появляется только один пик низкомолекулярной РНК (рис. 2в). «Фракция х» не является гибридом РНК — ДНК, поскольку она не окрашивается по Фельгену и не реагирует с дифениламином. Хроматография РНК азостойчивого материала на колонке целлюлозы не изменяла электрофоретический профиль препарата, что указывало на отсутствие в нем фрагментов одонитевой РНК, содержащей полиадениловую кислоту. При выделении цитоплазматической РНК из клеток М-437-2 и последующем ее

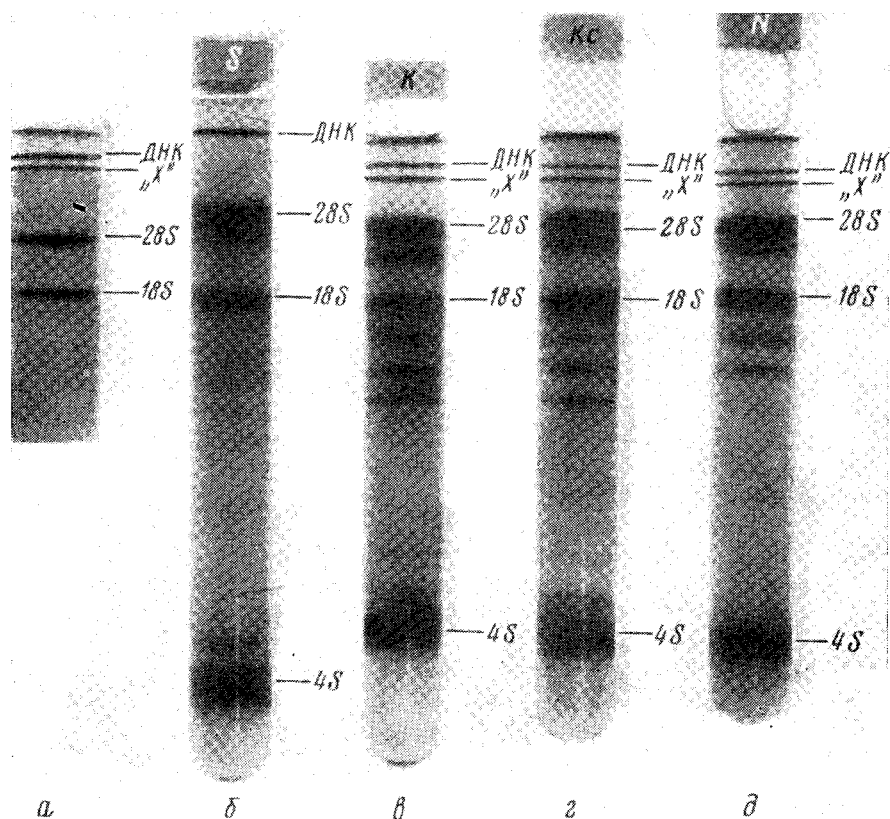


Рис. 2. Электрофореграммы препаратов нуклеиновых кислот, выделенных из различных штаммов *Saccharomyces cerevisiae*. а — М-437-2; б — 768₁-15; в — 1-768₁-15; г — 1-768₁-15; д — 2-1-768₁-15. а, б — препараты тотальных н.к.; в — д — препараты цитоплазматической РНК

электрофорезе наряду с фракциями, соответствующими рибосомальным и транспортным РНК, обнаружена и «фракция х», не изменившая положения и интенсивности окраски в сравнении с «фракцией х», обнаруженной при анализе тотальных н.к. Эти данные указывали на локализацию двунитовой РНК в цитоплазме дрожжевых клеток. Для установления связи этой РНК с различными компонентами цитоплазмы было определено ее содержание в трех фракциях разрушенных клеток М-437-2, выделенных дифференциальным центрифугированием. Метод выделения и состав этих фракций, установленный с помощью электронной микроскопии, соответствовали характеристике фракций, использованных для заражения прорастающих спор 768₁-15 цитоплазматическим детерминантом [к] (*). Из фракций выделяли цитоплазматическую РНК и анализировали ее в ПАГ. Фракция I

(митохондрии и обломки клеточной оболочки) не содержала двунитевой РНК. Фракция II (цитоплазматические мембраны, лизосомы, полисомы) содержала значительное количество этой РНК. Фракция III (полисомы, индивидуальные рибосомы) также содержала двунитевую РНК. Таким образом, двунитевая РНК оказалась ассоциированной с постмитохондриальной микросомальной фракцией клеточного содержимого М-437-2 и обнаружена во фракции II, при использовании которой получен феномен заражения детерминантом [k] ⁽²⁾.

Из расщепов штамма 1-768₁-15, полученного в результате обработки прорастающих спор 768₁-15 одной из фракций клеточного содержимого штамма М-437 ⁽³⁾ и содержащего [k], были выделены два клона: 1-1-768₁-15 К со слабой убивающей активностью при температуре не выше 30° и нейтральный 2-1-768₁-15. При скрещивании 1-1-768₁-15 с 768₁-27 все сегреганты 18 тетрад имели, как и сам гибрид, фенотип К. При скрещивании 2-1-768₁-15 с тем же штаммом все сегреганты были нейтральными. При скрещивании обоих штаммов с М-437-2 проанализировано по 15 тетрад каждого гибрида. Сами гибриды и их сегреганты оказались киллерами. Эти результаты указывают на цитоплазматический характер наследования признаков К у 1-1-768₁-15 и N у 2-1-768₁-15 и не противоречат предположению о содержании у соответствующих штаммов цитоплазматических детерминантов [k] и [n]. Исходный штамм, 768₁-15, согласно ранее полученным результатам, не содержал цитоплазматического детерминанта ⁽⁵⁾.

Цитоплазматическую РНК, выделенную из штаммов 768₁-15, 1-768₁-15, 1-1-768₁-15, 2-1-768₁-15 изучали электрофорезом в 2,5% ПАГ. Исходный штамм 768₁-15 не содержал «фракции х» (рис. 2). Остальные три штамма содержали эту фракцию (рис. 2).

Таким образом, двунитевая РНК, отсутствующая у исходного штамма S, имеющего генотип МММ₁ [o], появилась у него вместе с приобретением детерминанта [k] после обработки прорастающих спор фракцией клеточного содержимого штамма К, которая также содержала двунитевую РНК. Двунитевая РНК сохранялась у мутантов новообразованного штамма К, частично или полностью утративших убивающую активность. Эти данные указывают на то, что двунитевая РНК может детерминировать убивающую активность. Характерно, что у всех исследованных нами штаммов при применении обоих методов изоляции н.к. отсутствовала вторая фракция двунитевой РНК, обогащенная аденином, которая была обнаружена у штаммов К и N Корнельской коллекции и Оксфордских генетических линий ^(6, 7). Возможно, что эта фракция содержится в материале первого пика, обладающем большей электрофоретической подвижностью, чем «фракция х», поскольку детерминант [k] этих штаммов отличается по своим свойствам от детерминанта [k] Оксфордских генетических линий ⁽⁸⁾.

Ленинградский государственный университет
им. А. А. Жданова

Поступило
30 VII 1975

Всесоюзный научно-исследовательский
институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов
Москва

Научно-исследовательский институт онкологии
им. Н. Н. Петрова
Ленинград

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. A. Berry, E. A. Bevan, Nature, v. 239, 279 (1972). ² Г. Ф. Нестерова, Генетика, т. 10, № 6, 78 (1974). ³ A. C. Peacock, C. W. Dingman, Biochemistry, v. 6, 1818 (1967). ⁴ К. Бартон, В сб.: Методы исследования нуклеиновых кислот, М., «Мир», 1970, стр. 7. ⁵ Г. Ф. Нестерова, А. М. Зелнов, Вестн. Ленингр. ун-та, сер. биол., № 24, в. 4, 147 (1973). ⁶ J. M. Somers, E. A. Bevan, Gen. Res., v. 43, 71 (1969). ⁷ M. H. Vodkin, F. Katterman, G. R. Fink, J. Bacteriol., v. 117, 681 (1974). ⁸ Г. И. Наумов, Т. И. Паумова, Генетика, т. 9, № 11, 140 (1973).