



УДК 547.96;543.544;547.963.3

**АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ РНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ
НА КОЛОНКАХ С КОВАЛЕНТНО ИММОБИЛИЗОВАННОЙ
НА СЕФАРОЗЕ РИБОСОМНОЙ РНК***Преображенский А. А., Елизаров С. М.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова**Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва*

Разработан метод аффинной хроматографии РНК-связывающих белков. В качестве аффинного сорбента использовали иммобилизованную на сефарозе рибосомную РНК. Определены условия посадки РНК-связывающих белков на аффинную смолу и условия элюции. Показано, что при аффинной хроматографии не происходит потери какой-либо фракции РНК-связывающего белка, необходимой для образования информосоноподобных частиц.

РНК-связывающие белки являются классом белков, характерным, по-видимому, для клеток всех высших организмов [1—8]. Основным свойством этих белков является способность образовывать с РНК искусственные стехиометрические комплексы, в которых на одну весовую часть РНК приходится 3 весовые части белка [3, 9]. Эти комплексы были названы информосоноподобными частицами, поскольку соотношение РНК : белок в них такое же, как в естественных информосомах 1—3].

Очистка РНК-связывающих белков затруднена из-за их нестабильности и малого содержания в клеточных экстрактах (не более 0,3% от общего количества белков [1]). Кроме того, белки этого класса в различных объектах обнаруживают гетерогенность как по заряду [4, 5], так и по размеру [6]. В настоящей работе предпринята попытка применить аффинный подход к очистке РНК-связывающих белков из цитоплазматического экстракта мозга крупного рогатого скота.

Для аффинной хроматографии использовали рибосомную РНК *E. coli* MRE-600, ковалентно иммобилизованную на сефарозе. Эту смолу мы будем обозначать как сеф-РНК.

В первом опыте равные порции безрибосомного экстракта мозга хроматографировали на двух одинаковых по объему колонках, в одной из которых была сеф-РНК, а в другой — контрольная сефароза (без РНК). Было показано, что элюат с контрольной колонки (после предварительной промывки стандартным буфером) практически не содержал материала, поглощающего в УФ-свете, а его РНК-связывающая активность составляла менее 3% от активности, элюированной с колонки с сеф-РНК. Из этого следует, что сорбция РНК-связывающих белков на сеф-РНК происходит в основном именно за счет взаимодействия с иммобилизованной РНК.

В следующем опыте мы определили кинетику связывания РНК-связывающих белков с сеф-РНК. В нескольких одинаковых колонках инкуби-

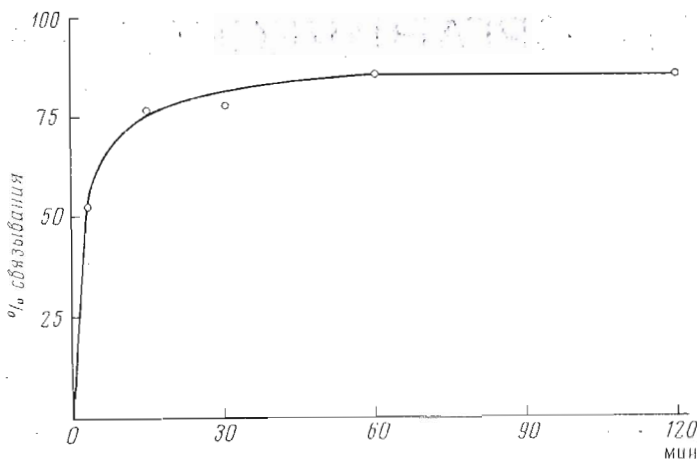


Рис. 1. Кинетика связывания РНК-связывающих белков с сеф-РНК. Каждая точка есть среднее значение трех параллельных измерений активности

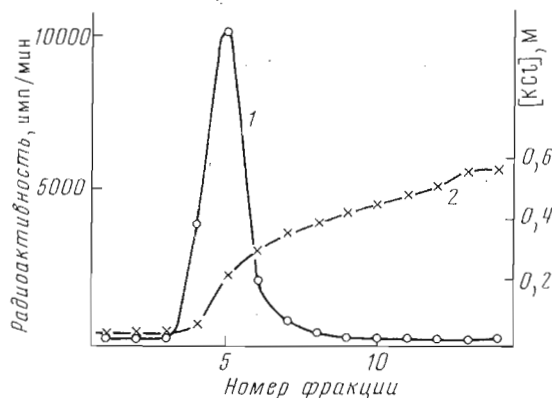


Рис. 2. Хроматография РНК-связывающих белков на сеф-РНК. 1 — РНК-связывающая активность, 2 — концентрация KCl

ровали равные порции экстракта в течение различного времени, затем колонки промывали стандартным буфером, после чего РНК-связывающие белки элюировали 1 М KCl в стандартном буфере. Из рис. 1 видно, что после 30 мин инкубации кривая связывания выходит на плато на уровне 85%. При 5-кратном избытке сеф-РНК, взятой на то же количество экстракта, процент связывания РНК-связывающих белков с сеф-РНК не увеличивается. Следовательно, существует некая часть РНК-связывающих белков (около 15% от общей активности в экстракте), которая в данных условиях не взаимодействует с иммобилизованной РНК.

Чтобы подобрать условия элюции РНК-связывающих белков с сеф-РНК, через колонку после инкубации с экстрактом и промывки стандартным буфером пропустили градиент концентрации KCl. На рис. 2 видно, что вся РНК-связывающая активность полностью определяется в элюате с колонки до концентрации KCl 0,4 М. Последующее пропускание через колонку 1 М KCl с 6М мочевиной не привело к вымыванию дополнительного количества белка, обладающего РНК-связывающей активностью. Полученный в результате аффинной хроматографии препарат обладает РНК-связывающей активностью, равной 2,22 млн. имп/мин, на 10Е₂₈₀, что в 12,5 раза выше удельной активности экстракта.

Таким образом, на колонках с сеф-РНК удается отделить от основной массы белков клеточного экстракта до 85% белков, обладающих РНК-

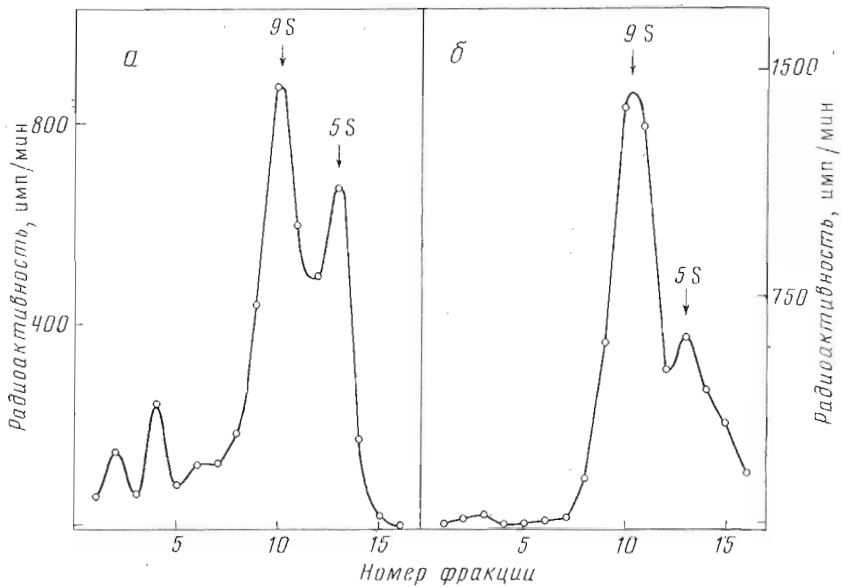


Рис. 3. Распределение белков, обладающих РНК-связывающей активностью при центрифугировании в сахарозном градиенте экстракта (а) и препарата белка, элюированного с колонки с сеф-РНК (б)

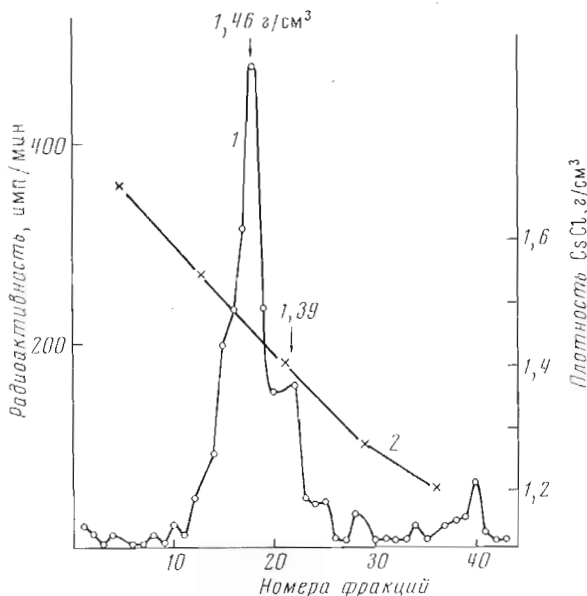


Рис. 4. Плотностное распределение в CsCl информосомоподобных частиц, образованных при добавлении ^{14}C рРНК в препарат белка после аффинной хроматографии: 1 — радиоактивность, 2 — плотность раствора CsCl

связывающей активностью; при этом для связывания достаточна 30-минутная инкубация экстракта с сеф-РНК при 4° .

В случае гетерогенности РНК-связывающего белка при очистке возможна потеря какой-то его определенной фракции.

Однако анализ седиментационного распределения в сахарозном градиенте РНК-связывающих белков неочищенного экстракта и препарата после аффинной хроматографии обнаруживает для обоих пре-

паратов аналогичное гетерогенное распределение с двумя максимумами: 9 и 5 S (рис. 3).

Главным контролем полноценности полученного препарата РНК-связывающих белков является их способность к образованию информосомоподобных рибонуклеопротеидных частиц. При смешивании препарата белка, полученного после аффинной хроматографии, с [^{14}C] рРНК такие частицы образуются (рис. 4). Поскольку полученные рибонуклеопротеидные комплексы имеют плавучую плотность, близкую к плавучей плотности в CsCl информосом ($1,4 \text{ г/см}^3$), можно заключить, что препарат белков, выделенный аффинной хроматографией на сеф-РНК, содержит все РНК-связывающие белки, необходимые для построения информосомоподобных частиц.

Экспериментальная часть

Для получения безрибосомного экстракта мозга крупного рогатого скота 50 г ткани больших полушарий гомогенизировали 30 с в ножевом размельчителе тканей при 8 000 об/мин без добавления буфера. После этого добавляли 50 мл буфера, содержащего 0,01 М триэтанолламин-HCl (рН 7,80—7,85), 0,01 М KCl, 0,001 М MgCl_2 , 0,001 М меркаптоэтанол (стандартный буфер) с 0,15 М сахарозой и гомогенизировали еще 2 мин. Гомогенат центрифугировали 30 мин при 30 000 g. Полученный экстракт диализовали в течение 18 ч (3 смены по 200 объемов стандартного буфера), после чего центрифугировали при 105 000 g в течение 90 мин. Все операции по получению безрибосомного экстракта и его дальнейшему фракционированию проводили при 4° . Полученный экстракт содержал 10,8 ОЕ $_{280}$ в 1 мл и обладал РНК-связывающей активностью, равной 0,178 млн. имп/мин на 1 ОЕ $_{280}$. РНК-связывающую активность определяли методом сорбции рибонуклеопротеидов на мембранных нитроцеллюлозных фильтрах, как подробно описано в работе [5], с использованием 23 S-[^{14}C] рРНК *E. coli*, полученной, как описано ранее [3]. Удельная радиоактивность 23S-[^{14}C] рРНК при просчете на жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-40 («Interteknik», Франция) в стандартной системе толуол-РРО-РОРОР была равна 11000 имп/мин на 1 мкг.

рРНК для ковалентного присоединения к сефарозе выделяли из препарата тотальной РНК *E. coli* осаждением 1,5 М NaCl, как описано ранее [3].

Ковалентное присоединение РНК к сефарозе 4В, активированной цианбромидом («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция), проводили по модифицированной методике Вагнера и соавт. [10]. На 1 г активированной сефарозы брали 16 мг рРНК *E. coli*, растворенной в 0,2 М Na-фосфатном буфере (рН 6,0), и объем смеси доводили тем же буфером до 8,4 мл. Смесь перемешивали на магнитной мешалке при 4° в течение 16—20 ч. От несвязавшейся РНК смолу отмывали 2 М NaCl, затем промывали водой. Для блокировки непрореагировавших с РНК активных групп смолу инкубировали со 100 мл 2 М глицинового буфера рН 6,9—7,2 при 4° в течение 12 ч. После инкубации смолу промывали последовательно 2М NaCl, водой и стандартным буфером. Чтобы определить, какое количество РНК ковалентно присоединилось к сефарозе, к части суспензии смолы добавляли РНКазу до конечной концентрации 10—15 мкг/мл и после инкубации в течение 1 ч при 25° в надосадочной жидкости] определяли концентрацию олигонуклеотидов по поглощению при 260 нм. При вычислении количества присоединенной РНК учитывали гиперхромизм РНКазного гидролизата. В наших опытах с сефарозой ковалентно связывалось от 4 до 10% взятой для инкубации РНК. Для получения контрольной сефарозы активированную цианбромидом сефарозу подвергали той же обработке, но без добавления РНК. Сеф-РНК, использованная в опытах, содержала 165 мкг ковалентно присоединенной рРНК в 1 мл набухшей сефарозы.

Емкость сеф-РНК по отношению к РНК-связывающим белкам составляла 7,58 млн. имп/мин на 1 мг иммобилизованной рРНК. В колонки с сеф-РНК вносили экстракт из расчета 5,3 млн. имп/мин РНК-связывающей активности на 1 мг иммобилизованной рРНК и инкубировали в колонках в течение 30 мин, после чего колонки промывали для полного удаления несвязавшихся компонентов 10 объемами стандартного буфера. В контрольном опыте по определению неспецифической сорбции на сефарозе элюцию белков проводили 1 М раствором КСl в стандартном буфере.

В опыте по элюированию РНК-связывающих белков с сеф-РНК градиентом концентрации КСl через колонку $0,6 \times 2,8$ см пропускали стандартный буфер с концентрацией КСl, возрастающей от 0,01 М до 0,56 М. Собирали фракции по 1 мл за 2 мин. Чтобы получить препарат РНК-связывающих белков для седиментационного анализа и образования информосомоподобных частиц, элюцию этих белков с колонки с сеф-РНК ($1,2 \times 14$ см) проводили 1 М КСl в стандартном буфере. Выделенный препарат (5 мл) диализовали в течение 2 ч против стандартного буфера (2 смены по 200 объемов) и отделяли центрифугированием при 10 000 g от агрегатов. После диализа и центрифугирования активность препарата уменьшалась на 40%. Седиментационный анализ белков проводили центрифугированием препаратов в линейном градиенте концентрации сахарозы, как подробно описано в работе [5], с той лишь разницей, что центрифугирование длилось в течение 15,5 ч вместо 20 ч.

Для получения информосомоподобных частиц к препарату белка после аффинной хроматографии добавляли $1/150$ часть того количества $23S$ - $[^{14}C]$ рРНК, которое могло бы быть связано на нитроцеллюлозном фильтре данным количеством РНК-связывающего белка. Смесь РНК-связывающих белков с $[^{14}C]$ рРНК инкубировали 30 мин при 4° , после чего частицы фиксировали формальдегидом [11]. Приготовленные растворы CsCl для градиента плотности — «тяжелого» раствора (без образца) и «легкого» (с образцом), а также вычисление плотности CsCl во фракциях после центрифугирования описано в работе [12]. Перед центрифугированием в пробирках ротора SW-60 центрифуги MSE «Superspeed-65» (Англия) создавали ступенчатый градиент плотности CsCl; на дно вносили 3 мл «тяжелого» раствора и сверху наслаивали 3 мл «легкого» раствора. Линейный градиент плотности CsCl создавался во время центрифугирования со скоростью 53 000 об/мин в течение 10 ч при температуре 20° .

Авторы выражают глубокую благодарность А. С. Спирину за постоянное внимание к работе и обсуждение результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Spirin A. S. (1969) *Eur. J. Biochem.*, **10**, 20—35.
2. Spirin A. S. (1972) in the *Mechanism of protein Synthesis and its Regulation* (Bosch. L., ed.) Ch. 16, 515—537.
3. Овчинников Л. П., Воронина А. С., Степанов А. С., Белицина Н. В., Спири А. С. (1968) *Молекулярн. биология*, **2**, 752—763.
4. Stepanov A. S., Voronina A. S., Ovchinnikov L. P., Spirin A. S. (1971) *FEBS Lett.*, **18**, 13—18.
5. Степанов А. С., Ворошина А. С., Овчинников Л. П., Спири А. С. (1972) *Биохимия*, **37**, 3—9.
6. Voronina A. S. (1973) *FEBS Lett.*, **32**, 310—312.
7. Преображенский А. А., Овчинников Л. П. (1974) *Докл. АН СССР*, **214**, 951—954.
8. Preobrazhensky A. A., Ovchinnikov L. P. (1974) *FEBS Lett.*, **41**, 233—237.
9. Воронина А. С., Степанов А. С., Преображенский А. А., Овчинников Л. П. (1972) *Биохимия*, **37**, 430—436.
10. Wagner A. F., Bugianesi R. L., Shen T. V. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **45**, 184—187.
11. Воронина А. С., Степанов А. С., Овчинников Л. П. (1972) *Биохимия*, **37**, 10—15.
12. Белицина Н. В., Овчинников Л. П., Спири А. С., Гейдон Ю. З., Чернос В. И. (1968) *Молекулярн. биология*, **2**, 727—735.

AFFINITY CHROMATOGRAPHY OF RNA-BINDING PROTEINS
ON THE COLUMNS WITH RIBOSOMAL RNA COVALENTLY IMMOBILIZED
ON SEPHAROSE

PREOBRAZHENSKY A. A., ELIZAROV S. M.

*Department of Biology, M. V. Lomonosov State University, Moscow,
A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

A method for affinity chromatography of RNA-binding proteins has been developed which utilized rRNA coupled to the CNBr activated Sepharose 4B. The conditions of binding of the RNA-binding proteins to the immobilized RNA and those of elution have been found. It was shown that during the affinity chromatography there is no loss of any RNA-binding protein fraction which is essential for informosome-like particles formation.
