



УДК 577.143.5

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА тРНК₂^{Leu} МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КОРОВ.
ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ Т₁-РНКАзного ГИДРОЛИЗАТА.
РЕКОНСТРУКЦИЯ ПОЛНОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ*

Тукало М. А., Васильева И. Г., Мацука Г. Х.

Институт молекулярной биологии и генетики Академии наук УССР, Киев

Власов В. В.

*Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР*

Микроспектрофотометрическими методами определена последовательность оснований в олигонуклеотидах Т₁-РНКАзного гидролизата тРНК₂^{Leu} молочной железы коров и проведена реконструкция нуклеотидной последовательности тРНК. Продукты гидролиза тРНК₂^{Leu} Т₁-РНКАзой разделяли на микроколонках с ДЕАЕ-целлюлозой в 7 М мочеvine при pH 7,5 с последующей рехроматографией при pH 3,7. Олигонуклеотиды идентифицировали по заряду, УФ-спектрам, составу и концевому анализу. Строение более сложных олигонуклеотидов изучали с использованием дополнительных методов: гидролиза пиримидил-РНКАзой, U₂-РНКАзой и неполного гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда. На основании данных построения олигонуклеотидов Т₁- и пиримидил-РНКАзного гидролизатов и их перекрывающихся последовательностей реконструирована полная первичная структура тРНК₂^{Leu}, которая подтверждается результатами, полученными методами быстрого гель-секвенирования.

Ранее нами было описано фракционирование лейциновых тРНК₂ молочной железы коров и показано наличие шести изоакцепторных тРНК₂^{Leu} в железе периода лактации [2, 3].

Данная статья посвящена описанию деталей исследования Т₁-РНКАзного гидролизата тРНК₂^{Leu}, первичная структура которой была опубликована нами ранее [4]. тРНК₂^{Leu} гидролизовали Т₁-РНКАзой и продукты гидролиза разделяли на микроколонках с ДЕАЕ-целлюлозой в 7 М мочеvine при pH 7,5 с последующей рехроматографией при pH 3,7 с использованием оборудования для микроколоночной хроматографии и микроспектрофотометрической приставки МСФП-3, созданных в Новосибирском институте органической химии СО АН СССР [5]. На рис. 1 и 2 представлены результаты хроматографии и рехроматографии олигонуклеотидов исчерпывающего Т₁-РНКАзного гидролизата тРНК₂^{Leu}. Как видно, большая часть олигонуклеотидов получена в индивидуальном состоянии в результате двух хроматографических разделений. Исключение представляют два тринуклеотида и два тетра нуклеотида, которые были разделены на дауэкс 1×2 в форматной системе.

В Т₁-РНКАзном гидролизате были обнаружены Gr и m²Gr, пять динуклеотидов, четыре тринуклеотида, 3'-концевой фрагмент АСССА, три тетра нуклеотида и четыре других более длинных олигонуклеотида, самым длинным из которых был тридекануклеотид. Олигонуклеотиды идентифицировали по заряду, УФ-спектрам, составу. Таким образом, были идентифицированы моно- и динуклеотиды. Анализ строения более сложных олигонуклеотидов производился с использованием дополнительных методов. Структуру олигонуклеотидов Т-7 — Т-10 удалось установить, приме-

* Предыдущее сообщение см. [1].

**Определение последовательности оснований в олигонуклеотидах полного
T₁-РНКазного гидролизата
тРНК₂^{Leu}**

Фракция	Олигонуклеотид	Метод расщепления	Продукты гидролиза, соотношение (моль/моль)
T-1	Cm ₂ Gp	ФДЭ, ФМЭ	C, m ₂ G (1,0:0,8)
T-3	m ^s CGp	То же	m ^s C ² , G (1,0:1,0)
T-4	CGp	»	C, G (1,0:1,0)
T-5	AGp	»	A, G (0,9:1,0)
T-6	UGp	»	U, G (1,0:1,0)
T-7	CAGp	T ₂ -РНКаза Концевой анализ	Ap, Cp, Gp (1,0:1,0:1,0) C
T-8	Cac ⁴ CGp	ФДЭ, ФМЭ Концевой анализ	C, ac ⁴ C, G (1,2:0,4:1,0) C
T-9	CUGp	ФДЭ, ФМЭ Концевой анализ	C, U, G (1,0:1,0:1,0) C
T-10	AUGp	ФДЭ, ФМЭ Концевой анализ	A, U, G (0,9:1,1:1,0) A
T-11	ACACCAoh	ФДЭ, ФМЭ T ₂ -РНКаза Концевой анализ	A, C (3,0:3,0) Ap, Cp (2,0:3,0) A
T-12	UCAGp	Пиримидил-РНКаза T ₂ -РНКаза Концевой анализ	2ACp, Cp Up, Cp, Ap, Gp (1,0:0,8:0,8:1,0) U
T-13	m ⁴ GNCGp	Пиримидил-РНКаза ФДЭ, ФМЭ	AGp, Up, Cp m ⁴ G, C, G (1,0:1,0:1,4)
T-14	TΨCGp	Пиримидил-РНКаза T ₂ -РНКаза Концевой анализ	m ⁴ GNp, Gp, Cp Tp, Ψp, Cp, Gp (1,0:1,0:0,9:1,1) T
T-15	UmUCAGp	T ₂ -РНКаза Концевой анализ	UmUp, Cp, Ap, Gp (0,9:1,1:1,1:1,0) Um
T-16	DDCAAGp	Пиримидил-РНКаза T ₂ -РНКаза 0,1 н. КОН Пиримидил-РНКаза Неполный гидролиз	AGp, UmUp, Cp Cp, Ap, Gp (1,0:2,1:0,9) Dp Cp, AAGp DDCp
T-17	UmCΨCCCUGp	ФДЭ T ₂ -РНКаза ФДЭ, ФМЭ	Ψp, Cp, Up, Gp (0,8:3,0:1,0:1,0) UmCp C, U, Ψ, G (4,2:2,0:0,7:1,0)
T-18	m ⁴ AAUCCACUUCUGp	Неполный гидролиз ФДЭ T ₂ -РНКаза ФДЭ, ФМЭ Пиримидил-РНКаза U ₂ -РНКаза	UmCΨ, UmCΨC, UmCΨCC, UmCΨCCC, UmCΨCCCU Cp, Up, Ap, Gp (4,5:3,8:2,0:1,0) C, U, A, m ⁴ A, G- (4,8:3,7:2,2:0,7:1,0) m ⁴ AAUp, ACp, 4Cp, 3Up, Gp UCCCAp, CUUCUGp

нив дополнительно концевой анализ. Остальные нуклеотиды исследовали с использованием гидролиза пиримидил-РНКазой, U₂-РНКазой и неполного гидролиза ФДЭ змеиного яда (ФДЭ). Результаты анализа строения олигонуклеотидов T₁-РНКазного гидролизата тРНК₂^{Leu} представлены в таблице. Ниже изложены детали определения структуры ряда олигонуклеотидов.

Пик T-2 (Gp и m²Gp). Смесь разделяли на колонке с дауэксом AG 1×8 в хлоридной системе и установили неомогенность пика гуаниловой кислоты. Поэтому в дальнейших экспериментах смесь обессоливали, гидролизировали фосфомоноэстеразой (ФМЭ) и разделяли на аминексе А-6, где

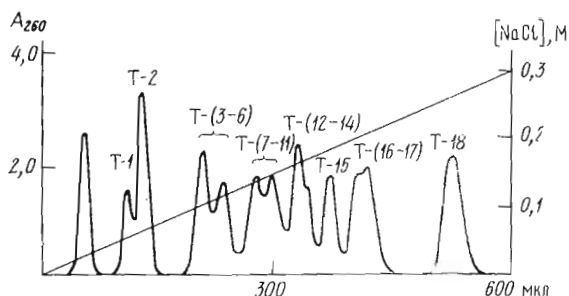


Рис. 1. Хроматография T_1 -РНКазного гидролизата $tRNK_2^{Leu}$ (0,3 ОЕ₂₆₀) из молочной железы коров на ДЕАЕ-целлюлозе в 7 М мочеине при 7,5, колонка 0,5×60 мм, скорость элюции 75 мкл/ч. Т-1, Т-2, Т-(3-6) и т. д.— обозначения объединенных фракций, подвергнутых рехроматографии

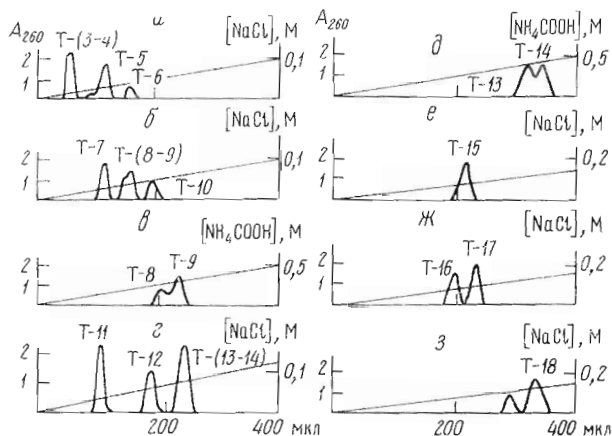


Рис. 2. Рехроматография олигонуклеотидов T_1 -РНКазного гидролизата $tRNK_2^{Leu}$ молочной железы коров. а, б, в, г, ж, з — рехроматография фракций Т-(3-6), Т-(7-11), Т-(12-14), Т-15, Т-(16-17) и Т-18 соответственно на ДЕАЕ-целлюлозе в 7 М мочеине при рН 3,7, колонка 0,5×40 мм, скорость элюции 75 мкл/ч; е и д — повторная рехроматография олигонуклеотидов Т-(9-10) и Т-(13-14) на дауэксе 1×2 в формиатной системе, колонка 0,5×150 мм, скорость элюции 75 мкл/ч

по УФ-спектрам и подвижности были идентифицированы гуанозин и N^2 -метилгуанозин.

Пики Т-8 (Cac^4CGp) и Т-9 ($CUGp$). Эти два тринуклеотида не разделяются при рехроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе при рН 3,7, что указывает на их близкий состав. При гидролизе олигонуклеотидного материала из пика Т-8 T_2 -РНКазой были обнаружены нуклеотиды Ср, Ур, ac^4Cp и Gr в мольных соотношениях 2 : 1 : 1 : 2, что говорит о присутствии в смеси двух тринуклеотидов. Предположение подтвердилось после разделения этих тринуклеотидов на дауэксе 1×2 в формиатной системе и определения нуклеозидного состава индивидуальных тринуклеотидов. Для $CUGp$ —C : U : G = 1,0 : 1,0 : 1,0 и для Cac^4CGp —C : ac^4C : G = 1,15 : 0,4 : 1,0. Малое количество ac^4C можно объяснить отщеплением ацетильной группы в щелочной среде. Концевым анализом было установлено, что на 5'-концах обоих тринуклеотидов находится цитидин. Таким образом, структура олигонуклеотидов Т-8 и Т-9 — Cac^4CGp и $CUGp$ соответственно.

Пик Т-11 ($ACACCAoh$). Определение нуклеотидного состава олигонуклеотида, соответствующего пику Т-11, дало адениловую и цитидиловую кислоту в мольном соотношении 2,0 : 3,0, а определение нуклеозидного состава гидролизом ФДЭ в присутствии ФМЭ — аденозин и цитидин в мольном соотношении 1,0—1,0 (или 3,0 : 3,0). Отсутствие гуанозина в составе олигонуклеотида свидетельствует о том, что этот олигонуклеотид является 3'-концевым в молекуле $tRNK$ ^{е.1}. Несоответствие в количестве адениновых остатков при анализе нуклеозидов и нуклеотидов олигонуклеотида Т-11 может указывать на то, что на 3'-конце этого нуклеотида находится

аденозин. Гидролиз панкреатической РНКазой дал мононуклеотид Ср и динуклеотид АСр. Уже на основании этих данных и знания универсальности строения акцепторного конца ССАоН можно предположить, что структура олигонуклеотида — АСАССАоН. Полученные данные по концевому анализу показали, что на 5'-конце олигонуклеотида Т-11 находится аденозин; следовательно, предложенная структура является единственно возможной.

Пик Т-13 (m'GNCGp). После гидролиза олигонуклеотида Т-13 ФДЭ и ФМЭ с последующей хроматографией на аминексе А-6 были идентифицированы нуклеотиды m'G, G и C в мольных соотношениях 1,0 : 1,38 : 1,0. Гидролиз панкреатической РНКазой дал мононуклеотиды Ср и Gr и динуклеотид m'GNp. Из этих данных логично вывести предварительную структуру (m'GN), C, Gr. Попытки определить концевой нуклеозид были неудачны, что связано с наличием в структуре олигонуклеотида двух минорных компонентов. Поэтому для выяснения остающегося неясным взаимного расположения m'GNp и Ср мы воспользовались знанием структуры олигонуклеотида из пиримидил-РНКазного гидролизата AGm'GNp, содержащего в своей структуре динуклеотид m'GNp. Сопоставление этих данных указывает на то, что структура олигонуклеотида Т-13 — m'GNCGp.

Пик Т-15 (UmUCAGp). При гидролизе пика Т-15 Т₂-РНКазой с последующим разделением продуктов гидролиза на колонке с дауэксом AG 1×8 были идентифицированы 2' (3')-фосфаты цитидина, аденозина и гуанозина и динуклеотид UmUp в мольных соотношениях 1,1 : 1,1 : 1,0 : 0,9. В результате гидролиза пентануклеотида Т-15 пиримидил-РНКазой были получены 2' (3')-фосфат цитидина и два нуклеотида — AGr и UmUp. Из данных по концевому анализу следует, что на 5'-конце олигонуклеотида находится уридин. Таким образом, структура пентануклеотида — UmUCAGp.

Пик Т-16 (DDCAAGp). Для определения состава пика Т-16 олигонуклеотид подвергали Т₂-РНКазному гидролизу с последующей хроматографией продуктов на колонке с дауэксом AG 1×8 в хлоридной системе. Идентификация пиков по положению на хроматограмме и спектральным данным показала наличие нуклеотидов Ср, Ар и Gr в мольных соотношениях 1,0 : 2,1 : 0,9. Таким образом, состав пика не соответствует месту элюции олигонуклеотида с DEAE-целлюлозной колонки при pH 7,5, так как он элюируется в области, соответствующей гексануклеотидам. Это может быть объяснено наличием в олигонуклеотиде двух остатков дигидроуридина. Действительно, дигидроуридин был идентифицирован в составе данного олигонуклеотида по специфическому уменьшению поглощения при 235 нм после добавления щелочи. При гидролизе олигонуклеотида Т-16 панкреатической РНКазой получали 2' (3')-фосфат цитидина и тринуклеотид АрАрGr при идентификации по УФ-спектрам и хроматографической подвижности. Следовательно, предварительную структуру олигонуклеотида пика Т-16 можно записать в виде (D, DC)AAGp. Окончательную структуру удалось установить при помощи метода неполного гидролиза ФДЭ змеиного яда, где среди продуктов по УФ-спектрам и подвижности был идентифицирован тринуклеотид DDCp, а динуклеотид по УФ-спектрам не обнаружили, что указывает на расположение пары DDp на 5'-конце гексануклеотида.

Пик Т-17 (UmCΨCCCUGp). В результате гидролиза пика Т-17 Т₂-РНКазой получили 2' (3')-фосфаты цитидина, дигидроуридина, уридина и гуанозина в мольных соотношениях 3,0 : 0,8 : 1,0 : 1,0 и динуклеотид UmCp. Нуклеозидный состав олигонуклеотида — G, C, U, Ψ (1 : 4,2 : 2 : 0,74). Последовательность нуклеотидов в данном олигонуклеотиде удалось установить методом неполного гидролиза ФДЭ. Были получены все продукты экзонуклеазной деградации олигонуклеотида Т-17, нуклеозидный анализ которых дал его однозначную структуру — UmCΨCCCUGp.

Пик Т-18 (m'AAUCCACUUCUGp). Исследование нуклеотидного состава этого олигонуклеотида показало наличие нуклеотидов Gr, Ср, Up и Ар в мольных соотношениях 1,0 : 4,5 : 3,8 : 2,0. Нуклеозидный анализ дал G, C, U, A и m'A в мольных соотношениях 1,0 : 4,8 : 3,7 : 2,2 : 0,7. Сопоставление этих результатов дает возможность сделать следующее заключение

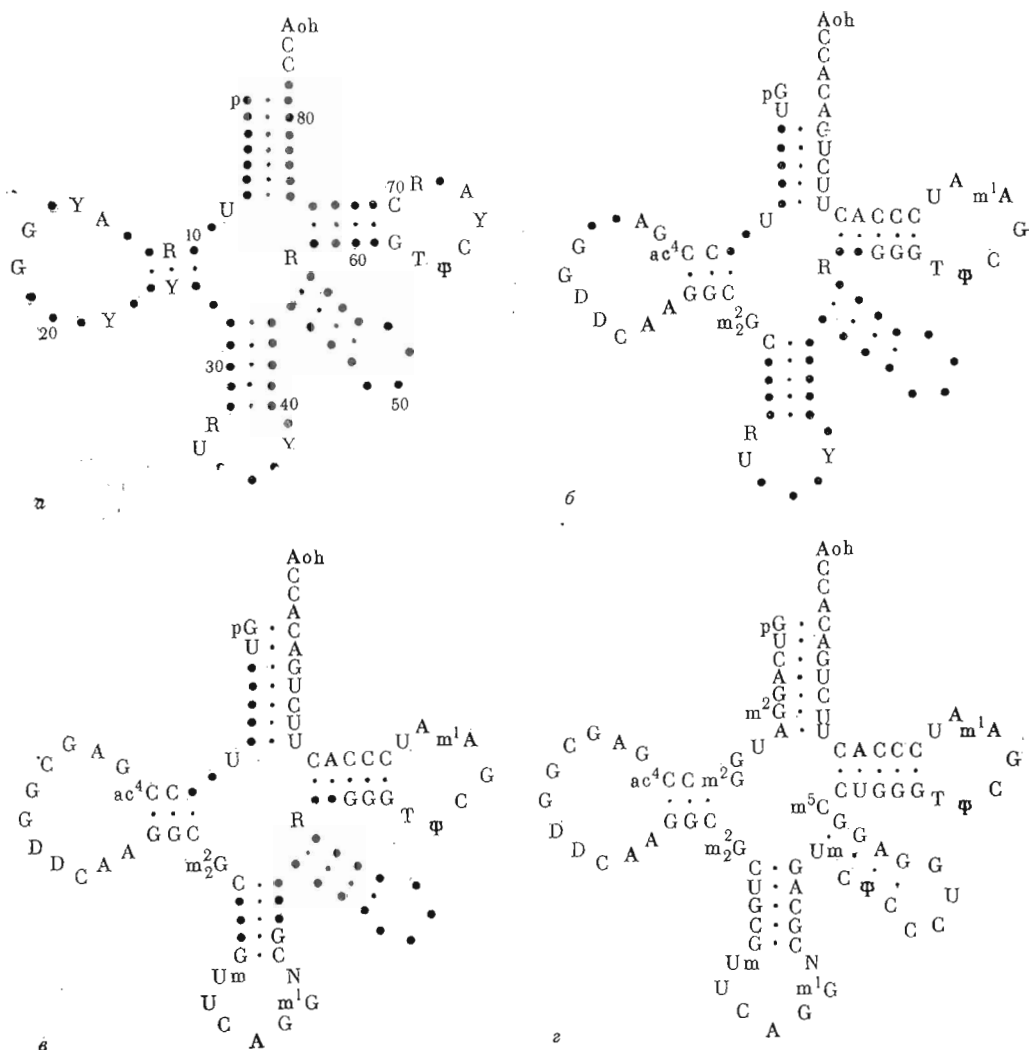


Рис. 3. Реконструкция первичной структуры тРНК^{Leu} (объяснения в тексте): а - обобщенная структура тРНК с инвариантными и полувариабельными нуклеотидами, б - расстановка олигонуклеотидов, содержащих минорные основания, в - реконструкция антикодоновой петли тРНК^{Leu}, г - полная структура тРНК^{Leu}. R - пурины, Y - пиримидины

о составе олигонуклеотида пика Т-18: G, 5C, 4U, 2A, m¹A. Наличие в смеси нуклеотида m⁶A объясняется миграцией метильной группы в условиях проведения гидролиза и хроматографии. Гидролиз панкреатической РНКазой дал 2'(3')-фосфаты цитидина и уридина, динуклеотид АСр и тринуклеотид m¹AAUp. Последний, как отмечается для олигонуклеотидов, содержащих метильные группы, имеет большую подвижность, чем соответствующие по длине аналоги. При хроматографии продуктов пиримидил-РНКазного гидролиза олигонуклеотида Т-18 на DEAE-целлюлозе в 7 М мочеvine при pH 7,5 m¹AAUp занимает позицию, предшествующую динуклеотиду АСр. Тринуклеотид m¹AAUp должен занимать 5'-положение в олигонуклеотиде Т-18, так как иначе нельзя объяснить положение N¹-метилгаденозина в тетра-нуклеотиде Р-7 из пиримидил-РНКазного гидролизата тРНК^{Leu}. Окончательную информацию о структуре тридекануклеотида получили после гидролиза его U₂-РНКазой, в результате которого образовались два больших фрагмента. Первый из них имеет в своем составе нуклеотиды Ср, Ар и Up в мольных соотношениях 2,5:1,0:1,1, второй - Gr, Up и Ср в мольных соотношениях 0,7:3,0:2,2. Наличие Gr в составе второго фрагмента указывает на его 3'-концевое положение в со-

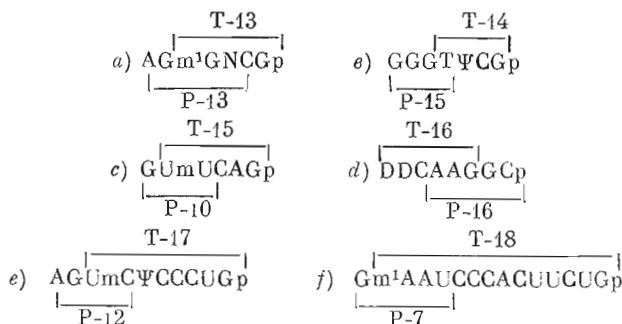
ставе тридекануклеотида. Концевой анализ первого фрагмента указывает на расположение уридина на его 5'-конце. Этого достаточно для выведения окончательной структуры UCCCAp. Концевой анализ второго фрагмента дал на 5'-конце цитидин. Полная структура фрагмента (CUUCUGp) была установлена на основании данных неполного гидролиза ФДЭ, в результате которого были получены продукты: CU, CUU, CUUC, CUUCU. Поскольку тринуклеотид m¹AAUp занимает 5'-концевое положение в тридекануклеотиде, а второй фрагмент U₂-РНКазного гидролиза CUUCUGp — 3'-концевое положение, полная структура олигонуклеотида Т-18 будет иметь следующий вид: m¹AAUCCCAUUCUGp.

Реконструкция нуклеотидной последовательности тРНК₂^{Leu}. При реконструкции первичной структуры тРНК₂^{Leu} руководствовались: 1) данными по общим для всех тРНК нуклеотидам и особенностям размещения минорных компонентов в цепи тРНК; 2) данными по строению олигонуклеотидов Т₁- и пиримидил-РНКазного гидролизата тРНК₂^{Leu} и их перекрывающихся последовательностей; 3) результатами гидролиза тРНК₂^{Leu} S₁-нуклеазой. Дополнительную проверку правильности реконструкции первичной структуры проводили методом быстрого гель-секвенирования ³²P-меченой тРНК.

Возможны несколько путей логического построения первичной структуры тРНК₂^{Leu}, которые приводят к одинаковой нуклеотидной последовательности. Здесь мы рассматриваем одну из таких возможностей.

Мы исходили из знания обобщенной Г. Дирхаймером [6] первичной структуры тРНК в виде клеверного листа (рис. 3а), имеющей несколько постоянных и ряд полувариабельных нуклеотидов. Олигонуклеотиды pGUp и ACACCAoh занимают соответственно 5'- и 3'-концевые положения тРНК₂^{Leu}. Это объясняется тем, что первый является единственным олигонуклеотидом пиримидил-РНКазного гидролизата с 5'-концевым фосфатом, а второй — единственным олигонуклеотидом Т₁-РНКазного гидролизата, который не содержит Gp.

Далее мы воспользовались наличием определенных перекрывающихся последовательностей между олигонуклеотидами пиримидил-РНКазного [1] и Т₁-РНКазного гидролизатов (схема)



При расстановке ряда блоков руководствовались особенностями размещения некоторых минорных компонентов в структуре тРНК. Как известно, минорные компоненты тимидин, 1-метиладенозин и тандем DD имеют во всех тРНК определенное размещение, поэтому блоки b, d и f, в состав которых входят эти минорные компоненты, заняли соответствующие места в структуре. Учитывалось также, что 4-ацетилцитидин в сериновых и лейциновых тРНК располагается в D-стебле, а m²G — в изгибе D- и авцепторного стебля (рис. 3, б).

Олигонуклеотид P-11 (GAGCp) занимает позиции 13–16 как единственный тетра нуклеотид в пиримидил-РНКажном гидролизате, содержащий на 5'-конце динуклеотид GAp (рис. 3в). Важную информацию для реконструкции структуры получили при гидролизе тРНК₂^{Leu} S₁-нуклеазой в условиях, при которых затрагиваются только экспонированные участки,

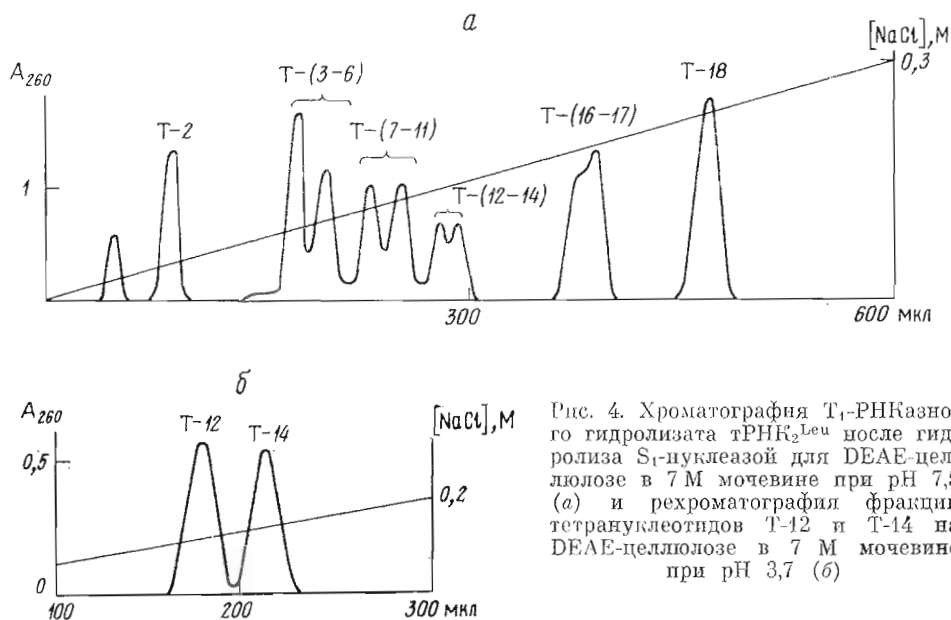


Рис. 4. Хроматография T_1 -РНКазного гидролизата $tRNK_2^{Leu}$ после гидролиза S_1 -пуклеазой для DEAE-целлюлозе в 7 М мочеvine при pH 7,5 (а) и рекроматография фракции тетрапуклеотидов T-12 и T-14 на DEAE-целлюлозе в 7 М мочеvine при pH 3,7 (б)

и последующего гидролиза T_1 -РНКазой. Анализ T_1 -РНКазного гидролизата $tRNK_2^{Leu}$ после гидролиза S_1 -пуклеазой показал исчезновение пиков, соответствующих олигонуклеотидам T-13 и T-15 (рис. 4). Исчезает также олигонуклеотид T-11. Так как T-11 является олигонуклеотидом акцепторного конца (ACACCAoh), то T-13 (m^1GNCGr) и T-15 ($UmUCAGr$) должны входить в состав наиболее четко экспонированной антикодоновой петли. Причем знание кодонов для лейцина позволяет считать, что пуклеотид Ar из олигонуклеотида T-15 должен занимать позицию 36. С 5'-конца с данной последовательностью перекрывается олигонуклеотид P-10 (рис. 3в), что позволяет реконструировать бóльшую часть антикодоновой петли.

После того как позиции 31–40 заполнены, блок e (схема) можно разместить только в вариабельной петле. Осталось расставить два длинных олигонуклеотида пиримидил-РНКазного гидролизата P-17 (AGm^2GAUr) и P-18 ($GGAGGm^2Cr$). Олигонуклеотид P-18 (исходя из длины) можно разместить только в вариабельной петле, тогда P-17 занимает позиции 4–8 в акцепторном стебле (рис. 3г). Из двух олигонуклеотидов T_1 -гидролизата, имеющих перекрывание с олигонуклеотидом P-17, CAGr (T-7) и UCAGr (T-12), только последний (T-12) может быть размещен в акцепторном стебле. Трипуклеотид CAGr (T-7) тогда будет удлинять перекрывание, образованное олигонуклеотидами P-12 и T-17. Позиции 28–30 в антикодоновом стебле занимает трипуклеотид CUGr, а оставшиеся позиции 9–11, 30–31 и 59–60 – трипуклеотид Gm^2GCr и динуклеотиды GCr и UCr (рис. 3г).

Полученная структура $tRNK_2^{Leu}$ отвечает принципу образования максимального количества комплементарных пар пуклеотидов. Дополнительно мы предприняли проверку установленной первичной структуры лейциновой $tRNK_2^{Leu}$ из молочной железы коров независимым методом быстрого гель-секвенирования ^{32}P -меченой по 3'-концу $tRNK$.

Специфическую деградацию меченой $tRNK$ проводили T_1 - и U_2 -РНКазами (данные не приведены), а также химическими агентами по Д. Питти [7, 8]. Результаты эксперимента представлены в виде автордиограммы на рис. 5. В этом случае расстановка олигонуклеотидов T_1 -РНКазного гидролизата вдоль полинуклеотидной цепи не составляет труда. Кроме того, легко расставить некоторые олигонуклеотиды пиримидил-РНКазного гидролизата ($GGAGGm^2C$, $GGGT$ и др.). Результаты электрофореза ^{32}P -меченых фрагментов $tRNK_2^{Leu}$ показывают, что олигонуклеотиды T_1 -РНКазного гидролизата T-18, T-17, T-15, расстановка которых очень существенна при логическом построении нуклеотидной последовательности $tRNK_2^{Leu}$,

занимают те же позиции, что и в реконструированной нами первичной структуре. Это же относится и ко всем остальным олигонуклеотидам T_1 -РНКазного гидролиза. Кроме того, данные по специфической деградации $tRNK_2^{Leu}$ химическими агентами, представленные на рис. 5, подтверждают такую нуклеотидную последовательность. Таким образом, первичная структура $tRNK_2^{Leu}$, установленная на основании данных ультрамикроспектрофотометрического анализа олигонуклеотидов T_1 - и пиридил-РНКазного гидролизатов $tRNK$ и некоторых дополнительных данных по S_1 -нуклеазному гидролизу $tRNK$, является правильной.

Установление нуклеотидной последовательности $tRNK_2^{Leu}$ показало, что с помощью микроспектрофотометрических методов можно решать любые структурные задачи. Для работы по расшифровке структуры $tRNK_2^{Leu}$, включая отработку микроспектрофотометрических методов, потребовалось 10 ОЕ $tRNK$. Дальнейшее повышение чувствительности и детектора позволит снизить количество $tRNK$, необходимое для анализа, еще на один-два порядка. Созданный недавно к КБ Новосибирского института органической химии СО АН СССР усовершенствованный вариант микроспектрофотометра серии «Обь» уже позволяет уменьшить исходное количество вещества в 6–8 раз. В настоящее время при расшифровке первичных структур $tRNK$ мы используем преимущества микроспектрофотометрических методов при идентификации минорных компонентов и в получении количественных данных и методов быстрого гель-секвенирования, где требуется малое количество материала и времени. Комплексное использование двух подходов при расшифровке структуры $tRNK$ позволит исходить из 0,5 ОЕ (10–20 мкг) полинуклеотида. Такое количество материала вполне доступно при изучении РНК высших организмов.

Экспериментальная часть

Выделение $tRNK_2^{Leu}$. Препарат индивидуальной $tRNK_2^{Leu}$ выделяли из суммарной $tRNK$ лактирующей молочной железы коров методами, описанными нами ранее [3].

Реактивы и ферменты: $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Amersham, Англия) уд. акт. 2000–3000 Ки/ммоль; нуклеозиды m^1A , m^6A , m^7G , m^2G , m^7G , m^3C , m^5C , T, Ψ и I (любезно предоставлены Т. В. Венкстери, ИМБ АН СССР, Москва); DEAE-целлюлоза 23SS (Serva, ФРГ), емкость 0,6 мг-экв/г; дауэкс 1×2 (Serva, ФРГ) для микроколонок с размером зерен 10–30 мкм получали фракционированием в аппарате Гамильтона [9]; дауэкс AG 1×8, AG 50×4, аминокс А-6, А-7, А-28 (Bio-Rad, США); акриламид и бисакриламид (Sigma, США); мочевины квалификации ос. ч. (7 М раствор мочевины дополнительно очищали на колонке с DEAE-целлюлозой); панкреатическая

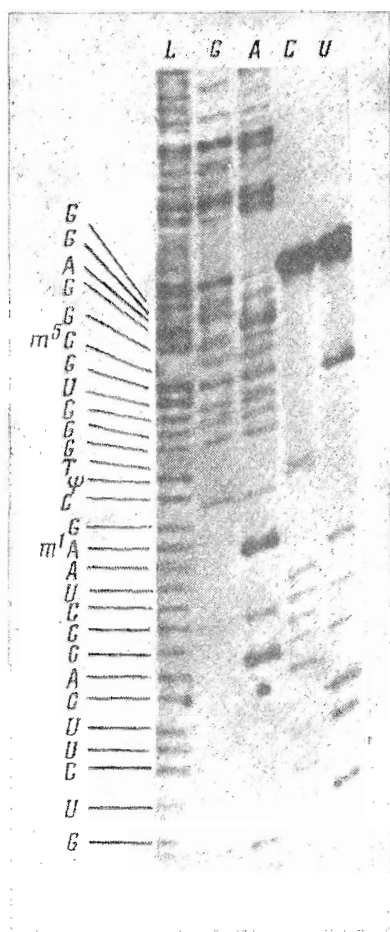


Рис. 5. Авторадиограмма гель-секвенирования $3'\text{-}^{32}\text{P}$ -меченой $tRNK_2^{Leu}$ из молочной железы коров с использованием метода специфической химической деградации по Д. Питти в 12% ПААГ. L – статистический разрыв $tRNK$ в 10% пиперидине

РНКаза (КФ 3.1.27.5; Worthington, США); T_1 -РНК и T_2 -РНКаза (КФ 3.1.27.3, КФ 3.1.27.1, Sankyo Co., Япония); щелочная фосфатаза из *E. coli* (ФМЭ) (КФ 3.1.3.1) и ФДЭ зменного яда (КФ 3.1.4.1) — фирмы Worthington (США); нуклеаза S_1 (КФ 3.1.30.1) — препарат СКТБ БАВ (Новосибирск).

Гидролиз тРНК T_1 -РНКазой проводили в течение 13 ч в 0,02 М трис-НСI-буфере, рН 7,5, при 37° С. В пробу объемом 30 мкл вносили тРНК и T_1 -РНКазу из расчета 0,4 ед. акт. фермента на 1 ОЕ₂₆₀ тРНК.

Гидролиз олигонуклеотидов пириимидил-тРНКазой. Обессоленные олигонуклеотиды T_1 -РНКазного гидролизата тРНК₂ расщепляли в течение 3 ч пириимидил-РНКазой в 0,01 М трис-НСI-буфере, рН 7,5, при 37° С. В 30 мкл реакционной смеси содержалось 0,02–0,05 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотида и 0,1 мкг пириимидил-РНКазы.

Гидролиз тРНК S_1 -нуклеазой проводили в условиях стабильности третичной структуры тРНК, как описано ранее [10]. Продукты полного T_1 -РНКазного расщепления разделяли на микроколонках с ДЕАЕ-целлюлозой при рН 7,5 в 7 М мочеvine и рехроматографировали на ДЕАЕ-целлюлозе при рН 3,7 [11] или на дауэксе 1×2 в формиатной системе [12].

Нуклеотидный состав олигонуклеотидов определяли с помощью гидролиза T_2 -РНКазой и хроматографии на дауэксе АГ 1×8 в хлоридной системе [13]. Состав нуклеозидов определяли посредством гидролиза ФДЭ с ФМЭ с последующей хроматографией на катионообменнике аминокс А-6 [11].

Методические подробности изучения структуры олигонуклеотидов изложены в предыдущей статье [1].

В качестве детектора использовали микроспектрофотометрическую приставку к СФ-4 [4], созданную в Новосибирском институте органической химии СО АН СССР. Оптическую плотность элюатов регистрировали при 250, 260, 270, 280, 290 нм. ³²P-тРНК получали, присоединяя ³²Pср к 3'-концу тРНК с помощью РНК-лигазы [14]. Специфическую деградацию меченой тРНК проводили T_1 - и U_2 -РНКазами [7]. Специфическую химическую деградацию проводили по Д. Питти [8].

Электрофорез полученных фрагментов осуществляли в 12,5 или 15% полиакриламидном геле (0,04×30×60 см) в 50 мМ трис-боратном буфере, рН 8,3, содержащем 1 мМ EDTA и 8,5 М мочеvine.

Автордиографию проводили при -40° С.

Мы приносим глубокую благодарность акад. Д. Г. Кнорре за постоянную поддержку и внимание к работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тукало М. А., Васильева И. Г., Мацука Г. Х., Власов В. В. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 1, с. 50–57.
2. Мацука Г. Х., Ельская А. В., Коваленко М. И., Корнелюк А. И. Транспортные рибонуклеиновые кислоты. Киев: Наукова думка, 1979, 219 с.
3. Коваленко М. И., Желтовская Н. И., Ельская А. В., Тукало М. А., Мацука Г. Х. В кн.: Методы молекулярной биологии. Киев: Наукова думка, 1979, с. 98–110.
4. Тукало М. А., Власов В. В., Васильченко И. Г., Мацука Г. Х., Кнорре Д. Г. Докл. АН СССР, 1980, т. 253, № 1, с. 253–256.
5. Грачев М. А. В кн.: Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1973, с. 104–122.
6. Dirheimer G., Keith G. In: Synthesis, structure and chemistry of transfer ribonucleic acids and their components. Poznan, 1976, p. 273–290.
7. Donis-Keller H., Maxam A. M., Gilbert W. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 8, p. 2527–2538.
8. Peattie D. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 4, p. 1760–1764.
9. Hamilton P. B. Anal. Chem., 1958, v. 30, № 5, p. 914–919.
10. Harada J., Dahlberg J. E. Nucl. Acids Res., 1975, v. 2, № 6, p. 865–871.
11. Тукало М. А., Васильченко И. Г., Власов В. В. В кн.: Методы молекулярной биологии. Киев: Наукова думка, 1979, с. 111–126.
12. Аксельрод В. Д., Венкстерн Т. В., Биев А. А. Биохимия, 1965, т. 30, № 5, с. 999–1004.
13. Власов В. В., Меламед Н. В., Чижиков В. Е., Тукало М. А. Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 6, с. 892–897.
14. Bruce A. G., Uhlenbeck O. C. Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, № 10, p. 3665–3677.

Поступила в редакцию 19.IV.1983
После доработки 29.VI.1983.

THE PRIMARY STRUCTURE OF tRNA₂^{Leu} FROM COW MAMMARY GLAND.
OLIGONUCLEOTIDES OF T₁ RNase DIGEST. THE RECONSTRUCTION
OF THE TOTAL NUCLEOTIDE SEQUENCE

TUKALO M. A., VASIL'eva I. G., MATSUKA G. Kh., VLASSOV V. V.

*Institute of Molecular Biology and Genetics, Academy of Sciences
of the Ukrainian SSR, Kiev; Institute of Organic Chemistry,
Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

The oligonucleotides obtained by digestion of tRNA₂^{Leu} from cow mammary gland with T₁ RNase were separated by micro-column chromatography on DEAE-cellulose in 7 M urea at pH 7,5 and 3,7, and in addition on Dowex 1×2. The digest consisted of 18 individual components, the larger being a tridecanucleotide. Micro-column chromatography of nucleotides on anion-exchanger AG 1×8 and nucleosides on Aminex A-6 was used to determine the base composition of the oligonucleotides. The oligonucleotide structure was established using terminal analysis, hydrolysis by pancreatic and U₂-RNases and incomplete hydrolysis by snake venom phosphodiesterases. The total primary structure of tRNA₂^{Leu} was derived from overlapping fragments isolated after its complete hydrolysis with pancreatic and T₁ RNase and using data obtained on S₁-nuclease digestion of tRNA. The methods of rapid gel-sequencing were also employed for checking the nucleotide sequence of tRNA₂^{Leu} from cow mammary gland.