



УДК 577.152.315'13:577.113.5:577.215

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА α -СУБЪЕДИНИЦЫ Na^+, K^+ -АТФ-азы
II. ВЫДЕЛЕНИЕ, ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И КЛОНИРОВАНИЕ
МАТРИЧНОЙ РНК

Петрухин К. Е., Броуде Н. Е., Арсенян С. Г.,
Гришин А. В., Джанджузян К. Н., Модянов Н. Н.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Матричная РНК, кодирующая α -субъединицу Na^+, K^+ -АТФ-азы, выделена из наружного мозгового слоя почек свиньи. мРНК дает полосу специфической гибридизации в области 25S – 26S с тремя олигонуклеотидными зондами, синтезированными на основании данных о структуре трех пептидов, выделенных из триптического гидролизата α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы.

Трансляция мРНК в ооцитах *Xenopus laevis* с последующей иммунохимической идентификацией продуктов синтеза подтвердила наличие мРНК α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы в обогащенной фракции poly(A^+)-РНК. Этот препарат использован для синтеза и клонирования двухцепочечной кДНК.

В предыдущем сообщении этой серии [1] были опубликованы результаты структурного анализа гидрофильных пептидов, образовавшихся при избирательном триптическом гидролизе α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы в составе мембранно-связанного фермента. На основании полученной информации были синтезированы специфические 17-членные олигонуклеотидные зонды, что позволило начать работы по анализу нуклеотидных последовательностей, соответствующих структурной части гена.

Настоящая работа посвящена выделению, характеристике и клонированию мРНК, кодирующей α -субъединицу Na^+, K^+ -АТФ-азы.

Выделение суммарной poly(A^+)-содержащей мРНК
из мозгового слоя почек свиньи

Наиболее интенсивно процессы активного транспорта Na^+ и K^+ осуществляются в наружном мозговом слое почек. Это связано с более высоким содержанием и, возможно, более активным синтезом Na^+, K^+ -АТФ-азы и соответственно мРНК, кодирующей субъединицы этого фермента. Известно, что α -субъединица содержит около 900 аминокислотных остатков [2] и, следовательно, кодирующая ее мРНК имеет длину не менее 2700 нуклеотидных звеньев. Выделение таких высокомолекулярных мРНК связано с необходимостью эффективного ингибирования внутриклеточных рибонуклеаз. Кроме того, еще одним требованием к методам выделения суммарной клеточной РНК является получение продукта, который мог бы эффективно транскрибироваться в реакции синтеза первой цепи кДНК. Для выделения суммарной РНК наиболее часто используются методы, основанные на применении сильного хаотропного агента — тиоцианата гуанидиния, быстро денатурирующего эндогенные рибонуклеазы [3, 4]. При использовании метода горячей фенольной депротеинизации в присутствии тиоцианата гуанидиния [4] нам удалось получить длинные недеградированные полирибонуклеотиды. Однако в дальнейшем при использовании poly(A^+)-содержащей фракции РНК (poly(A^+)-РНК) в реакции синтеза

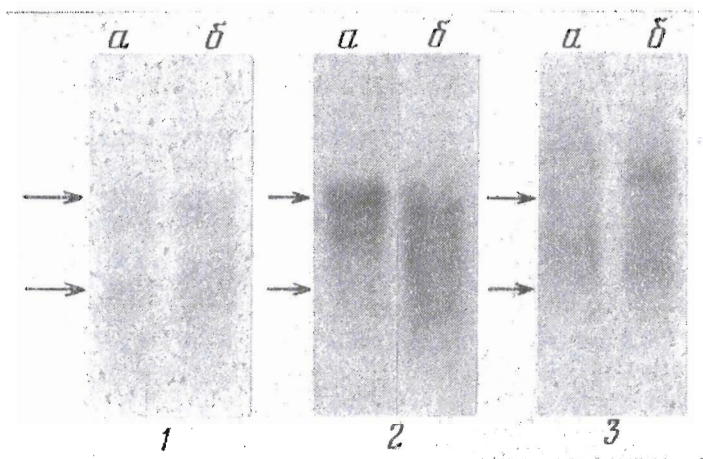


Рис. 1. Результаты гибридизации радиоактивно-меченых олигонуклеотидных зондов, комплементарных мРНК α -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы с иммобилизованной poly(A⁺)-РНК из почек свиньи. *a* – 15 мкг poly(A⁻)-РНК; *b* – 5 мкг poly(A⁺)-РНК. 1–3 – гибридизация РНК соответственно с зондами 1–3 (см. схему). Стрелками отмечено положение 28S и 18S рибосомных РНК

зондов с меньшей степенью вырожденности (например, зонд 1-б: 5' TT_C^T TG_A^G AAGGC_G^A TC_C^T TT3') [8].

Таким образом, результаты опытов по гибридизации мРНК со специфическими олигонуклеотидными зондами показали, что мРНК, кодирующая α -субъединицу Na^+ , K^+ -АТФ-азы, содержит около 3500 оснований, что хорошо согласуется с размером полипептидной цепи белка.

Получение обогащенной мРНК, кодирующей α -субъединицу

Использование фракции poly(A⁺)-РНК, обогащенной по содержанию мРНК α -субъединицы, в качестве исходного материала для клонирования имеет большие преимущества по сравнению с нефракционированной poly(A⁺)-РНК. Обогащение мРНК α -субъединицы в 10 раз позволяет во столько же раз сократить число клонов в репрезентативном банке кДНК, что значительно облегчает процедуру его скрининга. Обогащение poly(A⁺)-фракции РНК по содержанию мРНК α -субъединицы проводилось методом ультрацентрифугирования в градиенте концентрации сахаразы в присутствии 50%-ного формамида. В качестве материала для клонирования использовалась фракция РНК, давшая наиболее сильный сигнал гибридизации со смесевым зондом 1. Фракционирование poly(A⁺)-РНК в сахарозном градиенте позволило обогатить мРНК, кодирующую α -субъединицу- Na^+ , K^+ -АТФ-азы, в 10–20 раз.

Окончательным подтверждением наличия в выделенной фракции РНК мРНК α -субъединицы явились результаты трансляции мРНК в ооцитах *Xenopus laevis* с последующей иммунохимической детекцией синтезирующейся α -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы.

По предварительным теоретическим оценкам ожидаемая концентрация синтезированной α -субъединицы должна быть довольно низкой, всего 0,2–0,3 мкг/мл. Это требует высокой аффинности антител в моноспецифических иммунных сыворотках, используемых для иммунохимической детекции при трансляции специфической РНК в ооцитах. Нами был получен набор кроличьих иммунных сывороток, различающихся как степенью денатурации использованных в качестве антигена гомогенных препаратов α -субъединицы, так и сроками иммунизации каждым из антигенов. Тестирование сывороток проводили методом иммунодиффузии и по результатам осаждения иммунного комплекса антител с меченой ¹²⁵I α -субъединицей

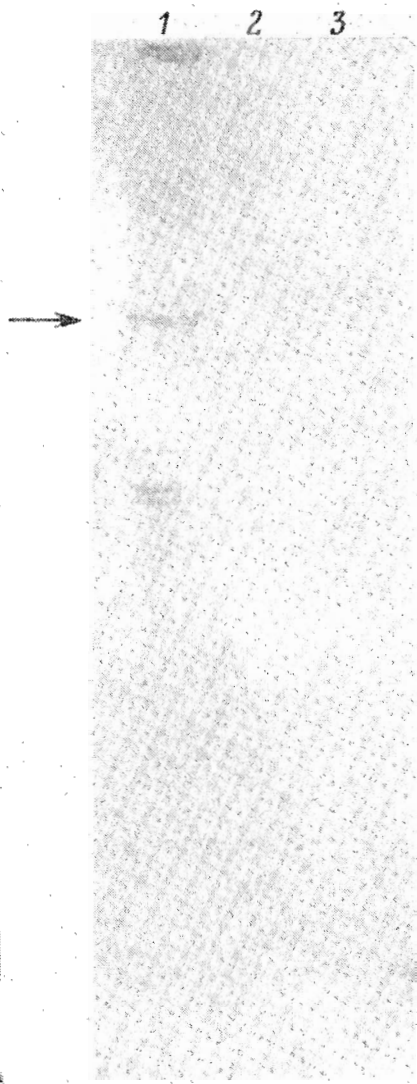


Рис. 2

Рис. 2. Результаты электрофоретического анализа иммунопреципитированных полипептидов, синтезированных в ооцитах *Xenopus laevis* при инъекции ооцитов poly(A⁺)-РНК, обогащенной по содержанию мРНК α -субъединицы (1), нефракционированной poly(A⁺)-РНК (2), буферным раствором (3) (условия см. «Экспериментальную часть»). Стрелкой отмечено положение маркерного белка α -субъединицы Na⁺, K⁺-АТФ-азы из почек свиньи

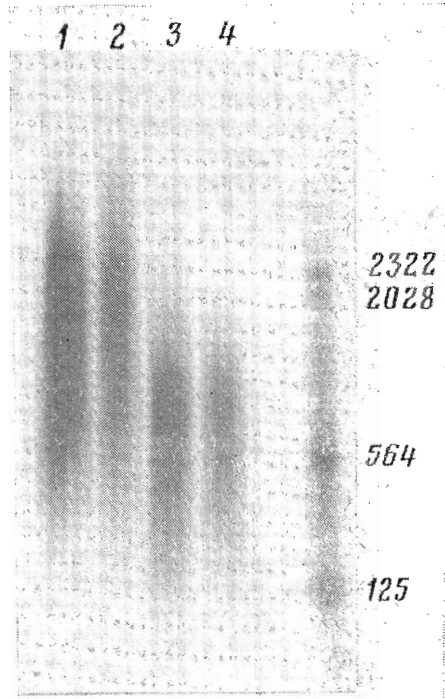


Рис. 3

Рис. 3. Электрофоретический анализ длины первой цепи кДНК, синтезированной с oligo(dT)-затравкой (1, 2) и с «рассеянной» затравкой (3, 4); 5 — гидролизат ДНК фага λ рестриктазой *Hind*III (приведена длина фрагментов в парах оснований)

Белок-А-сефарозой. Выбранная по этим тестам иммунная сыворотка осаждала 75% антигена из раствора с концентрацией 0,2 мкг/мл.

При инъекции 20 нг мРНК в один ооцит и дальнейшей инкубации в среде, содержащей [³⁵S]метионин, в экстракте, полученном из 30–50 лизированных ооцитов, после добавления антисыворотки и инкубации с Белок-А-сефарозой при электрофоретическом анализе отчетливо идентифицируется ³⁵S-меченый белок с подвижностью, соответствующей α -субъединице (рис. 2). В контрольном эксперименте — лизате неинъектированных ооцитов, а также в лизате ооцитов, инъектированных нефракционированной poly(A⁺)-РНК, этот белок не обнаруживается (рис. 2).

Синтез и клонирование кДНК

Основным критерием при подборе условий реакции синтеза первой цепи кДНК являлся синтез транскриптов, соответствующих размерам матрицы (3000 нуклеотидов и более). Для ингибирования рибонуклеазной активности, обусловленной наличием примесей РНКаз в препаратах обратной транскриптазы, в реакционную смесь добавляли ванадилрибонуклеозидные комплексы [9]. В результате аналитических экспериментов удалось подобрать условия, при которых эффективность синтеза первой цепи кДНК составляла 20–40% от количества исходной мРНК. При этом в случае иницирования синтеза первой цепи с помощью $\text{oligo}(\text{dT})_{12-18}$ было показано наличие транскриптов, соответствующих размерам матрицы (рис. 3).

При использовании в качестве затравки $\text{oligo}(\text{dT})_{12-18}$ в синтезируемом наборе кДНК достигается большая представительность 3'-концевых последовательностей матричных РНК. Для получения набора ДНК, комплементарного всем участкам мРНК, синтез первой цепи осуществлялся с использованием «рассеянной» затравки. Этот тип затравки представляет собой набор большого числа случайно выбранных олигонуклеотидов, полученных в результате статистического расщепления ДНК ДНКазой I [10]. Разнообразие этих олигонуклеотидов достаточно велико, чтобы некоторые из них оказались комплементарными последовательностям оснований матричной РНК. Следует отметить, что наиболее часто такая затравка используется для синтеза на мРНК радиоактивных зондов, применяемых в экспериментах по гибридизации. В нашем случае «рассеянная» затравка была применена для синтеза первой цепи кДНК с целью последующего клонирования и определения нуклеотидной последовательности фрагментов структурного гена α -субъединицы. Результаты анализа длины синтезированных транскриптов приведены на рис. 3. Как и следовало ожидать, с помощью $\text{oligo}(\text{dT})_{12-18}$ -затравки синтезируются более длинные транскрипты, чем с «рассеянной» затравкой. При этом в последнем случае выход продукта повышается в 2–2,5 раза. Синтез второй цепи кДНК проводился с помощью ДНК-полимеразы I и РНКазы H по методике [11] с выходом 50–90% от количества первой цепи. Двухцепочечную кДНК клонировали в рВВ 322, расщепленную *Pst*I, применяя технику dG-dC-липких концов. При трансформации клеток *E. coli* МН1 [12] рекомбинантной ДНК выход трансформантов составлял 10^2 – 10^3 клонов на 1 μg вставки.

При скрининге библиотеки клонов (10^5 колоний), полученной при синтезе первой цепи в присутствии «рассеянной» затравки, было найдено 17 клонов, дающих положительный сигнал при гибридизации с зондом 1-b [8]. В банке, полученном с $\text{oligo}(\text{dT})_{12-18}$ -затравкой ($2 \cdot 10^4$ клонов), обнаружены 2 положительных клона.

Результаты определения полной нуклеотидной последовательности, соответствующей структурной части гена α -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы, будут представлены в следующем сообщении.

Экспериментальная часть

В работе использовались: трис и ацетат натрия (Merck, ФРГ); сахароза, EDTA, MgCl_2 , β -меркаптоэтанол (Sigma, США); SDS (Bio-Rad, США); ванадилрибонуклеозидные комплексы (BRL, США); Белок-A-сефароза (Pharmacia, Швеция); $\text{oligo}(\text{dT})$ -целлюлоза, тип 7, $\text{oligo}(\text{dT})_{12-18}$ и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (P-L, США); тРНК (Boehringer, ФРГ), LiCl, NaCl, KCl и цитрат натрия квалификации ос. ч. (Союзреактив); рВВ 322, расщепленная *Pst*I с $\text{oligo}(\text{dG})$ -концами (NEN, США); [^{35}S]метионин (уд. акт. 1000 Ки/моль) и [α - ^{32}P]dCTP (уд. акт. 3000 Ки/моль) (Amersham, Англия); $\text{Na}[\text{^{125}I}]$ в щелочном растворе без носителя (уд. акт. 2050 Ки/моль) (Изотоп, Ленинград).

Обратная транскриптаза (КФ 2.7.7) с активностью 15 ед. акт./мкл в 50% глицерине была выделена А. В. Честухиным (ИБХ АН СССР) по ме-

тоту [13]; РНК-аза H (КФ 3.1.26.4) любезно предоставлена Н. В. Чичковой (межфакультетская лаборатория МГУ); ДНК-полимераза I (КФ 2.7.7.7) выделена Г. М. Долгановым (ИБХ АН СССР) по методу [14]; терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза — препарат фирмы P-L (США).

Выделение РНК. Мозговой слой почек свиьи вырезали сразу после забоя животных, быстро замораживали в жидком азоте и хранили в нем до выделения. 30 г замороженной ткани размельчали в гомогенизаторе в растворе, содержащем 3 М LiCl, 6 М мочевины, 10 мМ ацетат натрия (рН 5,0), 0,1% SDS и 10 мМ ванадилрибонуклеозидные комплексы. Осадок тотальной РНК обрабатывали по методу [5]. Выход составлял 0,5–1 мг на 1 г ткани. Poly(A⁺)-РНК выделяли на колонке с oligo(dT)-целлюлозой [7] с выходом 2%. Для дальнейшего обогащения poly(A⁺)-РНК центрифугировали в линейном градиенте концентрации сахарозы (5–25%) в буфере, содержащем 10 мМ трис-HCl (рН 7,4), 5 мМ EDTA, 50% формамид, в роторе SW-50.1 при 40 000 об/мин и 4°C в течение 24 ч. Градиент делили на 20 фракций, РНК из каждой фракции осаждали спиртом и хранили при -70°C.

Гибридизация РНК с олигонуклеотидными зондами. 5–10 мкг poly(A⁺)-РНК или 10–20 мкг poly(A⁻)-РНК анализировали электрофоретически в 1,5% агарозном геле, содержащем формальдегид [15]. Гибридизацию с олигонуклеотидными зондами проводили либо после переноса РНК на нитроцеллюлозный фильтр ([16] с. 198–199), либо непосредственно на высушенном геле (unblot) [17]. Состав прегибридизационной и гибридизационной смеси описан в работе [17]. Температура гибридизации подбиралась для каждого зонда эмпирически и составляла для зонда 1–40°C, для зондов 2 и 3 — 44°C. После гибридизации в течение 16–20 ч нитроцеллюлозный фильтр или высушенный гель отмывали при температуре гибридизации в буферном растворе, содержащем 0,33 М трис-HCl (рН 8,0), 0,5 М NaCl, 0,5% SDS, 0,1% пирогосфат натрия, и экспонировали с рентгеновской пленкой РМ-В.

Иодирование Na⁺, K⁺-АТФ-азы проводили по методу [18] в присутствии 1% SDS.

Тестирование антисывороток против α -субъединицы. В качестве антигена при иммунизации кроликов использовали препараты α -субъединицы в двух различных конформациях — полностью денатурированной и частично реактивированной [19]. Иммунодиффузию проводили как описано ранее [19]. Количество преципитируемого антигена проверяли следующим образом: к 20 мкл иодированного антигена (2,5 мкг/мл) добавляли 200 мкл раствора 10 мМ К-фосфатного (рН 7,0) буфера, содержащего 0,14 М NaCl, 5 мМ EDTA, 5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,5% ноидета Р-40 (PBSE/NP-40) и 20 мкл иммуноспецифической или контрольной сыворотки. Инкубировали 16 ч при 4°C, затем добавляли 40 мкл 50% суспензии Белок-А-сефарозы в растворе PBSE/NP-40 и продолжали инкубацию при 4°C еще 3 ч.

Образовавшийся тройной комплекс Белок-А-сефароза-антитело-антиген осаждали центрифугированием. Радиоактивность промытого осадка просчитывали на гамма-счетчике Rigamma (ЛКВ, Швеция) и по количеству осажденного антигена судили о способности сыворотки к связыванию малых количеств α -субъединицы.

По описанным тестам для дальнейшей работы была выделена сыворотка против частично реактивированной α -субъединицы, полученная после четырехкратной иммунизации в течение 6 месяцев.

Трансляция мРНК в ооцитах *Xenopus laevis* и анализ продуктов трансляции. В 30–50 ооцитов инъектировали по 60 нл раствора РНК (0,33 нг/нл в растворе 15 мМ трис-HCl (рН 7,6), 88 мМ NaCl). Инкубацию ооцитов с [³⁵S]метохином и их лизис проводили как описано в работе [16] (с. 320–322). Методика непрямой иммунопреципитации специфического продукта трансляции была аналогична описанной в работе [20].

Размер белка, осажденного специфической антисывороткой из лизата

инъцированных ооцитов, определяли электрофоретически в системе, предложенной Леммли [20], используя 10%-ный ПААГ.

Синтез и клонирование кДНК. Одноцепочную кДНК синтезировали по методу [16] (с. 225–229).

Синтез второй цепи кДНК с помощью ДНК-полимеразы I и РНКазы II проводили по методу [11]. Синтез oligo(dC)-последовательностей на 3'-концах кДНК, отжиг с расцепленной *Pst*I pBR 322 с oligo(dG)-концами и клонирование в *E. coli* МН1 [12] проводили по стандартным методикам ([11], [16], с. 234–238).

Авторы искренно признательны акад. Ю. А. Овчинникову и чл.-кор. Е. Д. Свердлову за постоянное внимание и ценные советы, а также А. Г. Зарайскому за помощь в проведении опытов с ооцитами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арзамасова Н. М., Аристархова Е. А., Шафиева Г. П., Назимов Н. В., Алданова Н. А., Модянов Н. Н. Биорган. химия, 1985, т. 11, № 12, с. 1598–1606.
2. Джанджугазян К. Н., Модянов Н. Н., Овчинников Ю. А. Биорган. химия, 1981, т. 7, № 6, с. 847–857.
3. Chirgwin J. M., Przybyla A. E., MacDonald R. J., Rutter W. J. Biochemistry, 1979, v. 18, № 24, p. 5294–5299.
4. Feramisco J. R., Heljman D. M., Smart J. E., Burridge K., Thomas G. P. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 18, p. 11024–11031.
5. LeMeur M., Glanville N., Mandel J. L., Gerlinger P., Palmiter R., Chambon P. Cell, 1981, v. 23, № 2, p. 561–571.
6. Aufray Ch., Rougeon F. Eur. J. Biochem., 1980, v. 107, № 2, p. 303–314.
7. Aviv H., Leder P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, № 6, p. 1408–1412.
8. Петрухин К. Е., Гришин А. В., Арсенян С. Г., Броуде Н. Е., Гринкевич В. А., Филиппова Л. Ю., Северцова И. В., Модянов Н. Н. Биорган. химия, 1985, т. 11, № 12, с. 1636–1641.
9. Berger S. L., Birkenmeier C. S. Biochemistry, 1979, v. 18, № 23, p. 5143–5149.
10. Taylor Y. M., Ilmensee R., Summers Y. Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 442, № 3, p. 324–330.
11. Gubler U., Hoffman B. J. Gene, 1983, v. 25, № 2/3, p. 263–269.
12. Casadaban M. J., Cohen S. N. J. Mol. Biol., 1980, v. 138, № 2, p. 179–207.
13. Myers Y. C., Ramirez F., Kacian D. L., Flood M., Spiegelman S. Anal. Biochem., 1980, v. 101, № 1, p. 88–96.
14. Kelley W. S., Stump K. H. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 9, p. 3206–3211.
15. Lehrach H., Diamond D., Wozney Y. M., Boedtker H. Biochemistry, 1977, v. 16, № 21, p. 4743.
16. Маниатис Т., Фрич Э., Сэлбрэк Дж. В кн.: Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
17. Meinkoth J., Wahl G. Anal. Biochem., 1984, v. 138, № 2, p. 267–284.
18. Greenwood F. S., Hunter W. M. Biochem. J., 1963, v. 89, № 1, p. 114–123.
19. Джанджугазян К. Н., Модянов Н. Н., Овчинников Ю. А. Биорган. химия, 1981, т. 7, № 12, с. 1790–1799.
20. McDonogh A. A., Hiatt A., Edelman J. C. J. Membrane Biol., 1982, v. 69, № 1, p. 13–22.

Поступила в редакцию
5.VII. 1985

PRIMARY STRUCTURE OF Na⁺, K⁺-ATPase.

II. ISOLATION, REVERSE TRANSCRIPTION AND CLONING OF MESSENGER RNA

PETRUKHIN K. E., BROUDE N. E., ARSENYAN S. G.,
GRISHIN A. V., DZHANDZHUGAZYAN K. N., MODYANOV N. N.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Messenger RNA, coding for the α -subunit of the Na⁺, K⁺ - ATPase, was isolated from outer medulla of pig kidney. Within 25S – 26S region the mRNA yields a band of specific hybridization with three oligonucleotide probes synthesized according to data on structures of three peptides isolated from the tryptic hydrolysate of the protein. Translation of the enriched poly(A⁺)-fraction of RNA in *Xenopus laevis* oocytes followed by the immunochemical identification of the products confirmed the presence of RNA coding for the desired protein. This RNA preparation was used for synthesis and cloning of double stranded cDNA.