



УДК 577.113.7:577.152.31*264'14

ПОВЫШЕНИЕ ИЗБИРАТЕЛЬНОСТИ НАПРАВЛЕННОГО ГИДРОЛИЗА РНК РНКазой H ИЗ *E. COLI* С ПОМОЩЬЮ СМЕШАННЫХ ОЛИГО(ДЕЗОКСИРИБО-РИБО)- НУКЛЕОТИДОВ

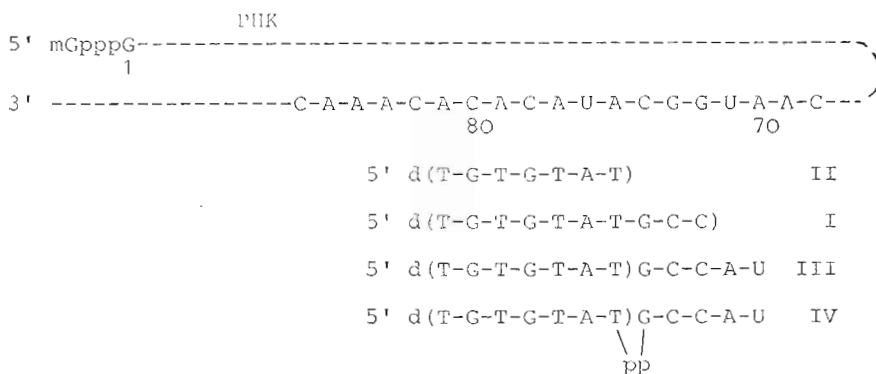
*Метелев В. Г., Крынецкая Н. Ф., Заякина Г. В.,
Родионова Н. П., Тюлькина Л. Г., Атабеков К. И.,
Карпова О. В., Атабеков И. Г., Шабарова Э. А.*

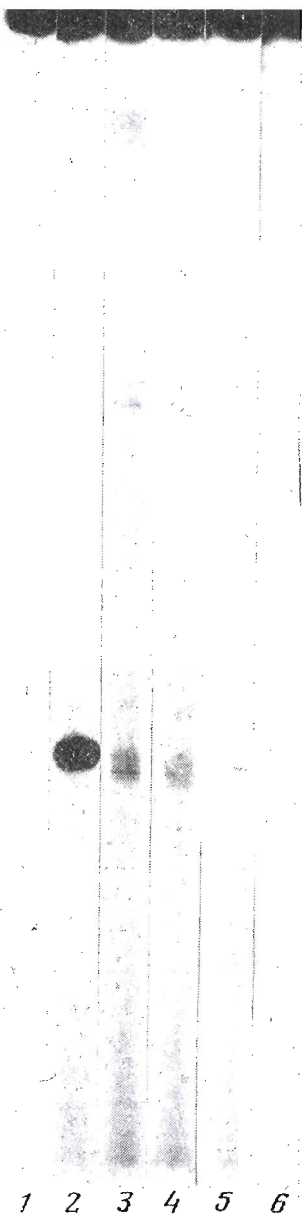
*Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова*

Метод специфического гидролиза в заданном участке молекул РНК РНКазой H из *E. coli*, направляемого синтетическими олигодезоксирибонуклеотидами, в настоящее время находит применение при изучении структуры и функции генома вирусных РНК [1-4] и рибосомных РНК [5, 6]. Более широкое использование этого метода ограничивается неконтролируемостью разрезания РНК в одной точке. Существенную роль в процессе избирательного разрезания играет вторичная структура выбранного участка РНК. Для получения специфических гетеродуплексов желателно использование 15-20-членных протяженных олигодезоксирибонуклеотидов, способных конкурировать с внутренними участками РНК за место связывания. Однако при обработке РНКазой H таких гетеродуплексов гидролиз РНК может происходить в любой точке выбранного района РНК (в пределах гетеродуплекса), вплоть до его полного выщепления [4, 7].

В настоящей работе для повышения избирательности расщепления РНК РНКазой H (КФ 3.1.26.4) предлагается изменить структуру узнаваемого ферментом гетеродуплекса, используя в качестве направляющих олигодезоксирибонуклеотидов смешанные олиго(дезоксирибо-рибо)нуклеотиды. В этом случае направленность гидролиза задается олигодезоксирибонуклеотидной частью, а специфичность взаимодействия определяется комплементарным взаимодействием протяженного смешанного олиго(дезоксирибо-рибо)нуклеотида.

В работе использовали следующие олигодезоксирибонуклеотиды и смешанные олиго(дезоксирибо-рибо)нуклеотиды (I) - (IV), содержащие фосфодиэфирную или пирофосфатную связи и комплементарные 5'-концевому участку РНК вируса табачной мозаики (схема).





Разделение в 12% ПААГ продуктов гидролиза РНК вируса табачной мозаики РНКазой Н в присутствии олигонуклеотидов (I) — (IV) (дорожки 3, 4, 1, 5 соответственно) и без олигонуклеотидов (дорожка 6). В качестве маркера взята тРНК^{Phе} из дрожжей (76 нуклеотидов) (дорожка 2)

Синтез нуклеотидов (III) [8] и (IV) проводили методом химического лигирования на комплементарной матрице под действием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимида $d(T-G-T-G-T-A-T)_p$ с G-C-C-A-U или $pG-C-C-A-U$ соответственно.

РНК выделяли фенольной депротенизацией из вирусного препарата, РНКазу Н получили как описано ранее [1]. Реакционная смесь для гидролиза РНК вируса табачной мозаики (30 мкл) содержала: 10 мкг РНК вируса, 0,2 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотида, в буфере А (10 мМ трис-НСl, рН 7,9; 0,15 М NaCl, 1 мМ MgCl₂, 0,1 мМ дитиотреит, 0,1 мМ EDTA), 0,02 ед. активности [1] РНКазы Н. РНК инкубировали 3 мин при 65°С с олигонуклеотидом, после охлаждения добавляли буфер А, РНКазу Н и оставляли на 1 ч при 2°С. Реакцию останавливали добавлением 2,5 объемов этанола. Продукты гидролиза (после введения 3'-³²P-концевой метки с помощью 5'-[³²P]цитидиндифосфата и T4-РНК-лигазы) анализировали электрофорезом в 12% ПААГ (рисунок).

Видно, что гидролиз РНК приводит к появлению дополнительных по сравнению с контролем (без олигонуклеотидов, дорожка 6) зон в районе ~80 нуклеотидов: четырех, трех, двух и одной при использовании олигонуклеотидов (I), (II), (III) и (IV) соответственно (дорожки 3, 4, 1, 5). Определение первичной структуры продуктов гидролиза показало, что все эти зоны соответствуют 5'-концевым фрагментам РНК вируса табачной мозаики, т. е. во всех случаях осуществляется олигонуклеотиднаправленное расщепление РНК.

Полученные результаты доказывают возможность применения смешанных олигонуклеотидов для направленного расщепления РНК. Кроме того, впервые показано, что целенаправленное изменение общей структуры олигонуклеотидов приводит к существенному повышению избирательности гидролиза.

В дальнейшем мы предполагаем осуществить синтез ряда смешанных олиго(дезоксирибо-рибо)нуклеотидов с природными и не природными межнуклеотидными связями и исследовать их способность направлять гидролиз РНК РНКазой Н с целью создания метода расщепления молекул РНК в заданной точке.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Stepanova O. B., Metelev V. G., Chichkova N. V., Smirnov V. D., Rodionova N. P., Atabekov I. G., Bogdanov A. A., Shabarova Z. A.* // FEBS Lett. 1979. V. 103. № 1. P. 197-199.
2. *Родионова Н. П., Карпова О. В., Метелев В. Г., Богданова С. Л., Шабарова З. А., Атабеков И. Г.* // Молекулярн. биология. 1983. Вып. 4. С. 809-817.
3. *Родионова Н. П., Тюлькина Л. Г., Карпова О. В., Атабеков И. Г.* // Докл. АН СССР. 1986. Т. 287. № 4. С. 1005-1009.
4. *Miller W. A., Bujarski J. J., Dreher T. W., Hall T. C.* // J. Mol. Biol. 1986. V. 187. № 4. P. 537-546.
5. *Гайда Г. З., Колосов М. П., Чичкова Н. В., Богданов А. А.* // Биоорган. химия, 1983. Т. 9. № 5. С. 678-683.
6. *Tarrich W. E., Hill W. E.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 3. P. 556-560.
7. *Mankin A. S., Skripkin E. A., Chichkova N. V., Kopylov A. M., Bogdanov A. A.* // FEBS Lett. 1981. V. 131. № 2. P. 253-256.
8. *Заякина Г. В., Крынецкая Н. Ф., Метелев В. Г., Шабарова З. А.* // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 2. С. 266-268.

Поступило в редакцию
17.II.1987

AN INCREASED SELECTIVITY OF RNase H-MEDIATED RNA CLEAVAGE DIRECTED BY CHIMERIC OLIGO(DEOXYRIBO-RIBO)NUCLEOTIDES

METELEV V. G., KRYNETSKAYA N. F., ZYAKINA G. V.,
RODIONOVA N. P., TYULKINA L. G., ATABEKOV I. G.,
KARPOVA O. V., ATABEKOV I. G., SHABAROVA Z. A.

M. V. Lomonosov Moscow State University

Chimeric oligo(deoxyribo-ribo)nucleotides appeared to be a valuable tool to achieve the high selectivity of RNA cleavage as shown by RNA-ase H-mediated hydrolysis of TMV RNA directed by d(TGTGTATGCC), d(TGTGTAT), d(TGTGTAT)GCCAU and d(TGTGTAT)ppGCCAU.