



УДК 577.217.33':543.544.4

**ПРЕПАРАТИВНОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ тРНК<sup>Phe</sup>  
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ  
ХРОМАТОГРАФИЕЙ***Булбичев Н. В., Грайффер Д. М., Карпова Г. Г.,  
Лебедев А. В.**Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения  
Академии наук СССР*

Предложена методика для быстрого препаративного выделения высокоочищенной Phe-тРНК<sup>Phe</sup> (1800 пмоль/1 ОЕ<sub>260</sub>) по схеме, включающей три последовательные обращенно-фазовые хроматографии тРНК на Lichrospher Si-1000 с привитыми алифатическими радикалами C<sub>18</sub> в градиенте концентрации ацетонитрила. На последней стадии хроматографируется обогащенная тРНК<sup>Phe</sup>, аминоацелированная фенилаланином.

Для многих исследований в области биоорганической химии и молекулярной биологии требуются индивидуальные тРНК. Традиционно для фракционирования тРНК используется хроматография на ВД-целлюлозе [1] либо на сефарозе 4В с использованием нисходящего градиента концентрации сульфата аммония [2–4]. Выделение тРНК по этим методикам требует относительно больших затрат времени; кроме того, эти методы не универсальны и могут использоваться лишь для получения довольно ограниченного набора индивидуальных тРНК. Кроме упомянутых методик для фракционирования тРНК использовалась система RPC-5 [5]. В этой системе производили наработку различных индивидуальных тРНК в больших количествах. Однако RPC-5 в настоящее время практически недоступна. Поэтому для фракционирования тРНК стали применять высокоэффективную жидкостную хроматографию на сорбентах, полученных на основе силикагеля с различными типами присоединенных гидрофобных или ионообменных групп. Так, в работе [6] гидрофобными группами являлись алифатические радикалы C<sub>2</sub>–C<sub>4</sub>, а элюцию вели нисходящим градиентом конденсации соли; в работе [7] использовали несколько различных типов сложных гидрофобных и ионообменных групп и элюцию вели как прямым, так и обратными солевыми градиентами. Однако в обоих случаях удовлетворительное разделение смесей тРНК достигалось только при очень малых количествах наносимой на колонку тРНК и максимальная оптическая плотность в пиках на хроматограммах не превышала 0,1 ОЕ<sub>260</sub>. Поэтому даже при значительных увеличениях линейных размеров колонок эти методики в неизменном виде не пригодны для препаративного выделения индивидуальных тРНК.

В настоящей работе для наработки индивидуальных тРНК применена обращенно-фазовая хроматография на силикагеле Lichrospher Si-1000 с привитыми алифатическими группами C<sub>18</sub> (в дальнейшем сорбент обозначается сокращенно LC<sub>18</sub>); в качестве элюента использован градиент концентрации ацетонитрила в буфере А, содержащем 10 мМ MgCl<sub>2</sub> и 100 мМ NaOAc, рН 5,5. Возможность препаративного получения высокоочищенных индивидуальных тРНК этим методом продемонстрирована на примере выделения Phe-тРНК<sup>Phe</sup> из препарата суммарной тРНК *E. coli*.

Для фракционирования 100 мг (2000 ОЕ<sub>260</sub>) тРНК *E. coli* использовали колонку размером 1×50 см. Хроматограмма приведена на рис. 1, где видно, что акцепторная активность по фенилаланину сосредоточена в середине профиля элюции. Очевидно, одной такой хроматографии для получения индивидуальных тРНК недостаточно. Так, для тРНК<sup>Phe</sup> наиболь-

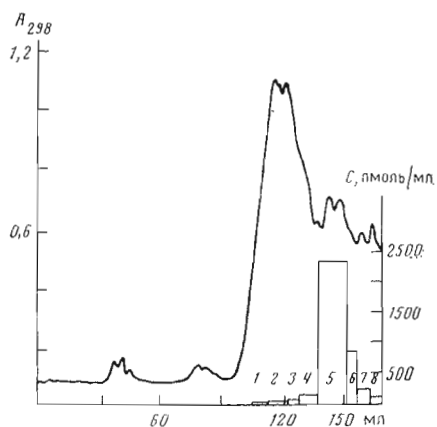


Рис. 1

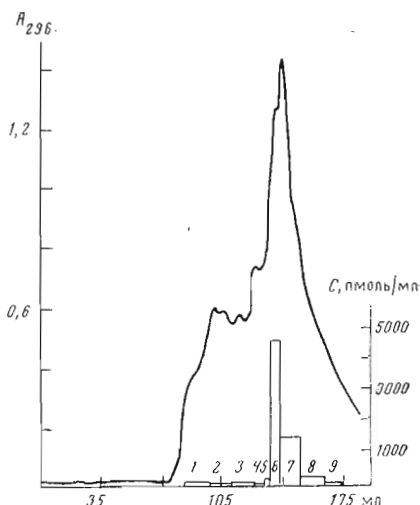


Рис. 2

Рис. 1. Хроматография 100 мг суммарной тРНК *E. coli* на  $LC_{18}$  в линейном градиенте концентрации ацетонитрила в буфере А (см. текст). Градиент концентрации ацетонитрила (0,15%/мин) от 0% . Пробу вводили в 1,5 мл буфера А. Скорость элюции 3 мл/мин. С — концентрация тРНК<sup>Phe</sup>, определенная во фракциях 1–8 по предельному уровню акцептирования [<sup>14</sup>С]фенилаланина

Рис. 2. Рехроматография фракции 5 (рис. 1) на  $LC_{18}$  в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0,13%/мин) от 2% в буфере А. Пробу вводили в 1 мл буфера А. Скорость элюции 3,5 мл/мин. С — см. подпись к рис. 1

шая акцепторная активность наблюдалась во фракции 5 (150 пмоль Phe на 1 ОЕ<sub>260</sub> тРНК), что соответствует примерно 5-кратному обогащению суммарной тРНК по тРНК<sup>Phe</sup>. Фракцию 5 (~300 ОЕ<sub>260</sub>), содержащую более 70% общего количества тРНК<sup>Phe</sup> (за 100% принято количество тРНК<sup>Phe</sup> во всех фракциях), осаждали 2,5 объема этанола, осадок тРНК отделяли центрифугированием, растворяли в буфере А и вновь хроматографировали (рис. 2). На этой стадии происходит небольшое дополнительное обогащение тРНК<sup>Phe</sup>. Получено 160 ОЕ<sub>260</sub> тРНК с акцепторной активностью 280 пмоль Phe на 1 ОЕ<sub>260</sub> тРНК.

Последняя, главная стадия выделения высокоочищенной тРНК<sup>Phe</sup> основана на том, что введение аминокислотного остатка в тРНК существенно влияет на ее хроматографические свойства. тРНК из объединенных

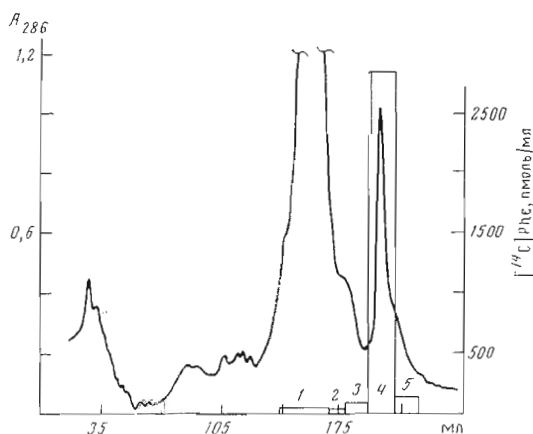


Рис. 3. Хроматография на  $LC_{18}$  аминокислотированной [<sup>14</sup>С]-фенилаланином тРНК, осажженной этанолом из объединенных фракций 6 и 7 рис. 2. Условия см. в подписи к рис. 2

фракций 6 и 7 (рис. 2) осаждали этанолом, растворяли в воде, аминоаццилировали [ $^{14}\text{C}$ ]фенилаланином и хроматографировали в описанной системе. На профиле (рис. 3) наблюдаются два основных пика, меньший из них содержит всю  $^{14}\text{C}$ -метку и по соотношению оптическое поглощение — радиоактивность состоит практически на 100% из Phe-тРНК $^{\text{Phe}}$  (1800 пмоль Phe на 1 ОЕ $_{260}$ ) в количестве 20 ОЕ $_{260}$  (36 нмоль). Вторая стадия очистки (рис. 2) необходима только для выделения очень чистой Phe-тРНК $^{\text{Phe}}$ . Исключив эту стадию, можно выделить Phe-тРНК $^{\text{Phe}}$ , обогащенную до 50—70% (900—1200 пмоль Phe на 1 ОЕ $_{260}$ ); чистота препарата может быть выше, если на колонку наносить меньше вещества.

Можно надеяться, что предложенная методика, включающая две или три хроматографии, может быть использована для выделения многих высокообогащенных аминоксил-тРНК. Вся процедура выделения Phe-тРНК $^{\text{Phe}}$  (три хроматографии, осаждения этанолом, определения профилей акцепторной активности, препаративное аминоксиллирование) занимает около 10 ч. В заключение следует отметить, что эксперименты по обогащению тРНК $^{\text{Phe}}$  на Lichrosorb RP-18 (Merck, ФРГ) с диаметром пор 100 Å не дали желаемого результата (степень обогащения по тРНК $^{\text{Phe}}$  была в 3—6 раз ниже, чем при использовании LC $_{18}$ ).

### Экспериментальная часть

В работе использовали тРНК *E. coli* (НПО «Биолар», Олайне ЛатвССР); [ $^{14}\text{C}$ ]фенилаланин (318 мКи/ммоль; UVVVR, ЧССР); ATP (Reanal, Венгрия), Lichrospher Si-1000 (Merck, ФРГ), октадецилтрихлорсилан (Fluka, Швейцария), триметилхлорсилан марки ч. отечественного производства. Толуол марки ч.д.а. перед использованием перегоняли. Хроматографию проводили на жидкостном хроматографе фирмы Waters (США) (насосы M-510, спектрофотометр Lambda Max, модель 481, инжектор U6K).

*Сорбент для хроматографии* — LC $_{18}$  — готовили следующим образом. 40 г Lichrospher Si-1000 (диаметр пор 1000 Å, размер частиц 10 мкм) сушили 5 ч в вакууме при 120° С, затем добавляли 140 мл толуола и 65 мл октадецилтрихлорсилана. Смесь кипятили с обратным холодильником 3 ч и оставляли на 12 ч при 20° С. Силикагель отфильтровывали, промывали последовательно (по 100 мл) толуолом, ацетонитрилом, 50% водным ацетонитрилом, ацетонитрилом, ацетоном. Снова сушили 2 ч в вакууме при 100° С и заливали смесью толуола (100 мл) и триметилхлорсилана (100 мл). Смесь выдерживали 12 ч при 20° С, затем сорбент отфильтровывали, промывали последовательно 100 мл толуола, ацетона и эфира. Колонку (1×50 см) наполняли этим сорбентом, прокачивая через колонку суспензию сорбента в изопропанол, с использованием установки Slurry packing фирмы Altech Ass (США) с насосом фирмы Haskel (США) при давлении 150—200 ат.

*Фенилаланил-тРНК-синтеза E. coli* (КФ 6.4.1.20), 85% чистоты по данным электрофореза в полиакриламидном геле, была любезно предоставлена В. Н. Анкиловой (НИБХ СО АН СССР). Определение акцепторной активности тРНК проводили следующим образом. Из хроматографических фракций отбирали пробы по 50 мкл. тРНК осаждали добавлением 2-кратного избытка этанола при -20° С, осадки отделяли центрифугированием, растворяли в 40 мкл буфера, содержащего 20 мМ MgCl $_2$ , 20 мМ трис-HCl (pH 7,5), 2 мМ ATP и 3·10 $^{-5}$  М [ $^{14}\text{C}$ ]фенилаланин, инкубировали 5 мин при 37° С. Затем добавляли фермент до концентрации 50 мкг/мл. Реакцию вели 20 мин при 20° С (за это время при концентрациях тРНК $^{\text{Phe}}$  0,1—5 ОЕ $_{260}$  достигается предельный уровень включения Phe в тРНК), аликвоты 10—20 мкл наносили на бумажные мишени 1×1 см, пропитанные трихлоруксусной кислотой. Мишени трижды промывали 5% трихлоруксусной кислотой при 0° С, затем этанолом, сушили и измеряли радиоактивность в толуольном сцинтилляторе. Препаративное аминоксиллирование проводили в таких же условиях (концентрация тРНК $^{\text{Phe}}$  составляла 10 $^{-5}$  М); реакционную смесь перед добавлением фермента делили на равные части по 0,6 мл. По окончании реакции смеси вновь объединяли, добавляли NaOAc (pH 5,5) до концентрации 0,3 М и тРНК осаждали этанолом.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Gilliam I. C., Millward S., Blew D., von Tigerstrom M., Wimmer E., Tener C. M. // Biochemistry. 1967. V. 6. № 10. P. 3043—3057.
2. Spencer M. // J. Chromatogr. 1982. V. 238. № 2. P. 307—316.
3. Spencer M., Binns M. // J. Chromatogr. 1982. V. 238. № 2. P. 297—306.
4. Hatjild G. W. // Meth. Enzymol. 1979. V. 59. P. 215—218.
5. Pearson R. L., Weiss J. F., Kelmers A. D. // Biochim. et biophys. acta. 1971. V. 228.

- № 3. P. 770-774.  
6. Pearson J. D., Mitchell M., Regnier F. E. // J. Liquid Chromatogr. 1983. V. 6. № 8. P. 1441-1457.  
7. Rassi Z., Horvath C. // J. Chromatogr. 1985. V. 326. № 1. P. 79-90.

Поступила в редакцию  
4.II.1987  
После доработки  
22.V.1987

**PREPARATIVE ISOLATION OF INDIVIDUAL tRNA<sup>Phe</sup> BY  
HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

**BULYTCHEV N. V., GRAIFER D. M., KARPOVA G. G., LEBEDEV A. V.**

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division,  
Academy of Sciences of the USSR*

A method of rapid preparative isolation of Phe-tRNA<sup>Phe</sup> (*E. coli*) of almost 100% purity (1800 pmoles per 1 OE<sub>260</sub>) is developed. It includes three successive chromatographies of total tRNA on C<sub>18</sub>-modified Lichrosphere Si-1000 in acetonitrile gradients. Other individual tRNAs can be isolated by the same approach.