



УДК 577.113.4 : 577.152.312\*64

© 1990 г.

*М. А. Зенкова, Г. Г. Карпова, А. С. Левина***РАСЩЕПЛЕНИЕ АЛКИЛИРОВАННОЙ 16S рРНК ПО УЧАСТКАМ СВЯЗЫВАНИЯ АДРЕСОВАННЫХ РЕАГЕНТОВ — ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ — С ПОМОЩЬЮ РНКазы Н***Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР*

Впервые показана принципиальная возможность расщепления цепи РНК с помощью РНКазы Н в составе аддуктов, образующихся в результате комплементарно адресованной модификации 16S рРНК 2',3'-O-[4-N-метил-N-(2-хлорэтил)аминобензилиденовыми] производными олигодезоксирибонуклеотидов d(pACSTTGTT)гА и d(pTTTGCTCCCC)гА. Сравнение результатов расщепления 16S рРНК РНКазой Н в составе гетеродуплексов с этими олигонуклеотидами и в составе ковалентных аддуктов с бензилиденовыми производными этих же олигонуклеотидов показало: 1) комплементарно адресованная модификация протекает как в совершенных, так и в несовершенных комплексах; 2) 16S рРНК в составе ковалентных аддуктов, образующихся в результате алкирования как в совершенных, так и в несовершенных комплексах, расщепляется РНКазой Н; несовершенные дуплексы значительно стабилизируются ковалентной связью между остатком реагента и основанием РНК; 3) несовершенные комплексы 16S рРНК со свободными олигонуклеотидами отличаются низкой стабильностью, даже при высоких концентрациях олигодезоксирибонуклеотидов расщепление 16S рРНК с помощью РНКазы Н в таких гетеродуплексах не происходит. Предложенный метод расщепления РНК в составе ковалентных аддуктов может быть использован для определения сайтов связывания адресованных реагентов с молекулой РНК.

Комплементарно адресованная модификация нуклеиновых кислот реакционноспособными производными олигонуклеотидов, образующих комплементарные комплексы с определенными участками матрицы, — один из перспективных методов для направленного воздействия на выбранные фрагменты нуклеиновых кислот [1, 2]. Химические аспекты и потенциальные возможности направленной модификации нуклеиновых кислот функциональными производными олиго- и полинуклеотидов подробно рассмотрены в обзорах [3—6].

Сайт-направленное алкилирование ДНК в принципе позволяет расщепить цепь ДНК по модифицированному основанию [7]. В работах [8, 9] на примере направленной модификации 303-членного фрагмента ДНК реакционноспособными производными олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих 4-N-метил-N-(2-хлорэтил)аминобензиламинный или 4-N-метил-N-(2-хлорэтил)аминобензилиденный остатки на 5'- или 3'-конце соответственно, было продемонстрировано высокоселективное алкилирование и следующее за ним расщепление ДНК вблизи участка связывания олигонуклеотида. Однако для сайт-направленной модификации РНК пока не подобраны условия расщепления молекулы РНК по модифицированному основанию, что затрудняет идентификацию участков модификации. Кроме того, ряд данных по сайт-направленному алкилированию РНК (тРНК [10, 11], 16S рРНК [12]) указывает на то, что комплементационная точность узнавания несовершенна и может приводить к множественной модификации РНК вследствие образования как совершенных комплексов, так и комплексов, в которых не все основания адреса образуют комплементарные пары с основаниями участка связывания. Для того чтобы оценить, какое количество таких несовершенных комплексов действительно реализуется, а также для расщепления молекулы РНК вблизи участка алкилирования, мы использовали подход, основанный на свойстве РНКазы

Н расщеплять цепь РНК в составе гетеродуплекса РНК·ДНК, предложенный в работе [12].

Комплементарно адресованная модификация нуклеиновых кислот приводит к образованию продуктов, содержащих ковалентно связанный с мишенью (за счет алкилирования) реагент. В дальнейшем продукты сайт-направленной модификации, в которых олигонуклеотидный адрес связан с модифицированным основанием РНК через модифицирующую группу реагента, будут называться ковалентными аддуктами. Чтобы сохранить в составе ковалентного аддукта все комплексы, в составе которых происходило алкилирование 16S рРНК, необходимо подобрать условия расщепления РНКазой Н, максимально близкие условиям сайт-направленного алкилирования (50 мМ трис-НСl, рН 7,4; 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,35 М KCl). С другой стороны, необходимо учитывать, что высокие концентрации ионов магния (более 10 мМ) и одновалентных катионов (более 100—150 мМ), хотя и стабилизируют гетеродуплекс, значительно ингибируют специфическую активность РНКазы Н, не подавляя при этом активность примесных нуклеаз [14].

На рис. 1а приведены кинетические кривые гидролиза poly([<sup>14</sup>C]rA)·poly(dT) РНКазой Н в стандартных условиях гидролиза РНКазой Н (буфер А) [14] и в условиях, предложенных в работе [15], для тестирования: с помощью гидролиза РНКазой Н гетеродуплексов олигодезоксирибонуклеотидов с 16S рРНК в различных конформационных состояниях (буфер В); буфер ТМК<sub>350</sub> — буфер реконструкции рибосом, использовавшийся без 1,4-дитиотреита для комплементарно адресованной модификации 16S рРНК, а в присутствии 0,2 мМ дитиотреита — для гидролиза РНКазой Н (состав буферных растворов см. в «Экспериментальной части»).

Для гидролиза в буфере В характерно более быстрое протекание реакции по сравнению с буфером А (плато достигается уже через 10 мин — рис. 1а, кривые 1 и 3), хотя при этом происходит значительное ингибирование активности фермента: для полного гидролиза субстрата необходимо примерно 10-кратное увеличение количества РНКазы Н в реакционной смеси (см. рис. 1а, кривые 2 и 3). Полный гидролиз poly([<sup>14</sup>C]rA)·poly(dT) в буфере А при 20° С происходит за 40 мин при концентрации фермента 0,5 мкг/мл. В буфере В в таких же условиях гидролизует не более 20% субстрата, тогда как в буфере ТМК<sub>350</sub> гидролиз гетеродуплекса практически не происходит (см. рис. 1а). Это объясняется ингибированием РНКазы Н высокими концентрациями ионов калия и магния (оптимальные условия для работы РНКазы Н — концентрации Mg<sup>2+</sup> 0,5—1,0 мМ и K<sup>+</sup> 8—12 мМ [14]). При увеличении времени инкубации субстрата с РНКазой Н в буфере В до 3 ч количество радиоактивности в кислото-растворимой фракции возрастает всего на 15%, что связано, вероятно, с гидролизом полинуклеотида за счет незначительных нуклеазных примесей в препаратах РНКазы Н.

На рис. 1б приведены кинетические кривые расщепления poly([<sup>14</sup>C]rA)·poly(dT) в буфере В в зависимости от количества РНКазы Н, добавленной в реакционную смесь. Отчетливо видно, что практически количественный гидролиз субстрата (около 90%) происходит при концентрации фермента 100 мкг/мл. В дальнейшем такие концентрации РНКазы Н использовались для расщепления 16S рРНК в комплексе с олигонуклеотидами p(dACCTTGTT)rA (I), p(dTTTGCTCCCC)rA (II) или для расщепления алкилированной бензилиденовыми производными этих олигонуклеотидов (I\* или II\* соответственно) 16S рРНК.

Дезоксиолигонуклеотид (I) полностью комплементарен 3'-концевому фрагменту 16S рРНК (1498—1506), а (II) — последовательности 772—782 (нумерация нуклеотидов дана по [16]). Кроме этих участков, образующих совершенные комплексы с (I) и (II), с помощью метода контекстного анализа был выявлен ряд последовательностей, способных образовывать с этими олигонуклеотидами несовершенные комплексы (подробно см. [12]). При расщеплении 16S рРНК РНКазой Н в составе совершенного гетеродуплекса с олигонуклеотидом (II) должны образоваться два фрагмента приблизительно равной длины (~775 нуклеотидов), которые не разделя-

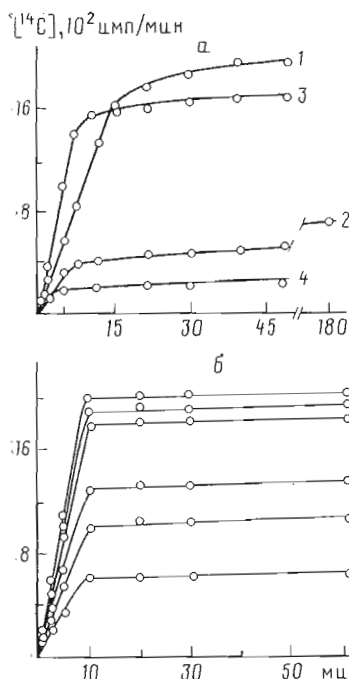


Рис. 1

Рис. 1. Кинетические кривые расщепления комплекса poly([<sup>14</sup>C]rA)poly(dT) (2 мкг/мл) РНКазой Н при 20° С. а — в различных буферах при концентрации РНКазы Н 0,5 мкг/мл (1 — в буфере А, 2 — в буфере В, 3 — в буфере В, но 5 мкг/мл РНКазы Н, 4 — в буфере ТМК<sub>333</sub>); б — в буфере В при концентрации фермента 0,5 (1), 2,5 (2), 5 (3), 10 (4), 25 (5), 50 мкг/мл (6). По оси абсцисс дано количество радиоактивности в кислоторастворимой фракции

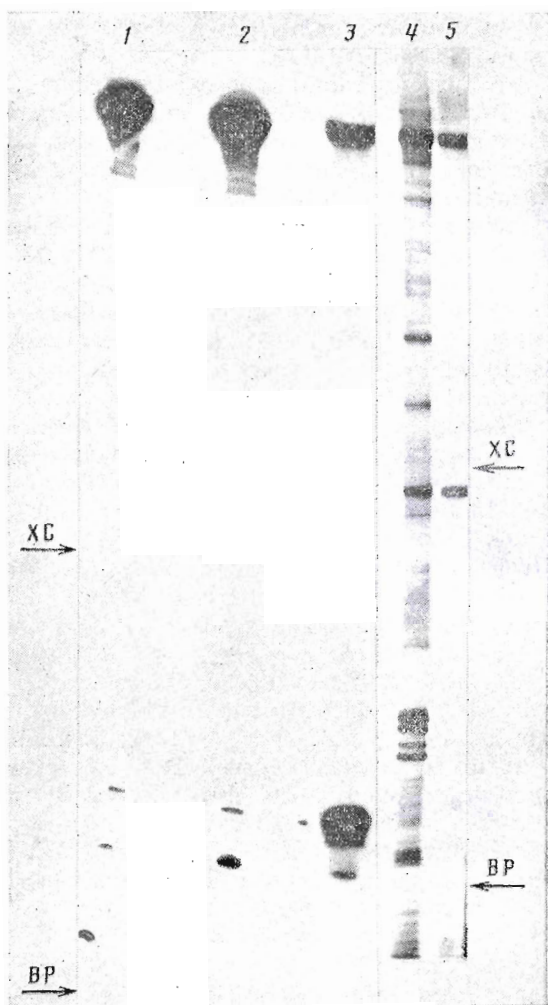


Рис. 3

Рис. 3. Разделение продуктов гидролиза 16S рРНК РНКазой Н в гетеродуплексе с реагентом (I) и в составе ковалентного аддукта 16S рРНК-(I\*) ( $\alpha = 0,75$ ) электрофорезом в 6% ПААГ. <sup>32</sup>P-метка введена после гидролиза РНКазой Н. 1 — исходная 16S рРНК; 2 — 16S рРНК + РНКазы Н; 3 — 16S рРНК + РНКазы Н + 50-кратный избыток (I); 4 — ковалентный аддукт 16S РНК-(I\*) + РНКазы Н; 5 — такой же ковалентный аддукт без обработки РНКазой Н. На рисунке приведены два разных электрофоретических разделения: дорожки 1—3 и 4, 5

ются в 4% денатурирующем ПААГ. Расщепление РНКазой Н аналогичного гетеродуплекса с олигонуклеотидом (I) должно приводить к отщеплению 3'-концевого фрагмента длиной 36—43 нуклеотида; при анализе такого гидролизата в 4% ПААГ подвижности расщепленной и исходной 16S рРНК не будут различаться, но в области выше бромфенолового синего в 4% ПААГ (см. рис. 3, 3) должна появиться полоса, соответствующая 3'-концевому отщепляемому фрагменту.

На рис. 2 (дорожки 1—7) показано расщепление 16S рРНК в составе гетеродуплекса с олигонуклеотидом (II) в зависимости от его избытка. Уже при 10-кратном избытке (II) (дорожка 2) наблюдается количественное расщепление 16S рРНК по участку 772—782. Однако даже при

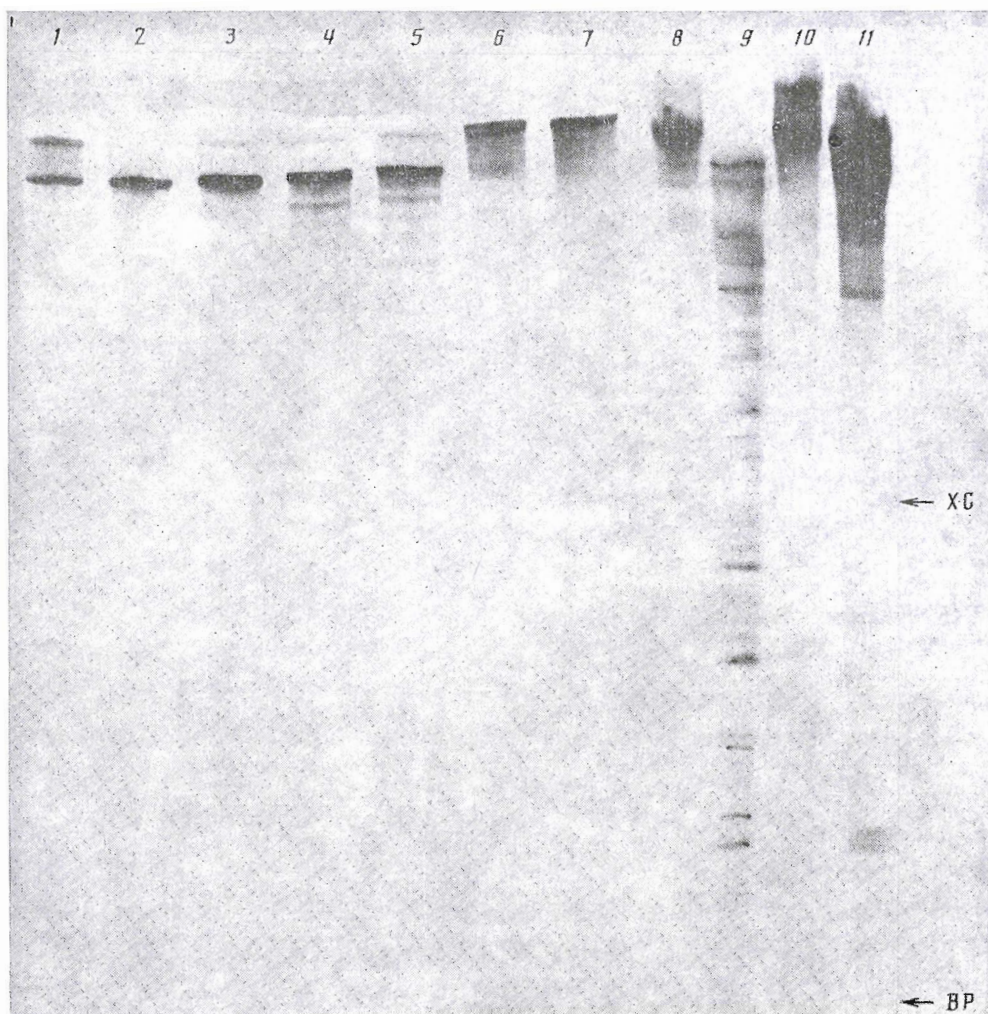


Рис. 2. Разделение продуктов гидролиза РНКазой H 16S рРНК в гетеродуплексе с реагентом (II) и в ковалентных аддуктах с реагентами (I\*) и (II\*) с помощью электрофореза в 6% ПААГ (7 М мочевины). Окраска метиленовым синим. Соотношение 16S рРНК — (II): 1 : 5 (1), 1 : 10 (2), 1 : 20 (3), 1 : 50 (4), 1 : 100 (5); 6 — 16S рРНК в отсутствие (II). 7 — 16S рРНК без обработки РНКазой H; 9 — ковалентный аддукт 16S- (II\*) ( $\alpha = 0,70$ ); 11 — ковалентный аддукт 16S рРНК — (I\*) ( $\alpha = 0,58$ ); 8 и 10 — такие же аддукты с реагентами (II\*) и (I\*) соответственно без гидролиза РНКазой H. XC — ксиленианол GE, BP — бромфеноловый синий

100-кратном избытке (II) в данных условиях практически не происходит расщепления 16S рРНК по другим участкам, способным образовывать несовершенные дуплексы с олигонуклеотидом (II) [12]. Аналогичная картина наблюдается при гидролизе 16S рРНК в комплексе с 50-кратным избытком олигонуклеотида (I) (рис. 3, 3): расщепление происходит по единственному участку 1498—1506. Очевидно, это объясняется тем, что несовершенные комплексы значительно менее стабильны по сравнению с комплексами, образованными олигонуклеотидами (I) и (II) с последовательностями 16S рРНК 1498—1506 и 772—782 соответственно.

На рис. 2 (дорожки 9 и 11) приведено разделение фрагментов 16S рРНК, полученных в результате гидролиза РНК в составе ковалентных аддуктов, образующихся при алкилировании 16S рРНК реагентами (I\*) и (II\*) соответственно. Комплементарно адресованное алкилирование и выделение модифицированной 16S рРНК подробно описано в [12, 17]. Степень модификации ( $\alpha$ ) РНК реагентами (I\*) и (II\*) составила 0,58 и 0,70 моль остатков реагента, ковалентно связанных с 1 моль 16S рРНК

соответственно. Из приведенных данных видно, что даже при такой достаточной низкой степени модификации происходит множественное расщепление 16S рРНК РНКазой Н в составе ковалентных аддуктов (особенно для реагентов (II\*)), которое легко объясняется существованием наряду с совершенными гетеродуплексами ряда несовершенных комплексов, в которых также происходит эффективное алкилирование 16S РНК реагентами (I\*) и (II\*). Ввиду того что множественное расщепление РНК в составе ковалентных аддуктов можно было бы отнести к неспецифическому расщеплению интактной РНК следами нуклеаз в процессе алкилирования и выделения, на рис. 2 (дорожки 8 и 10) показаны результаты электрофореза ковалентных аддуктов 16S РНК-(II\*) и 16S РНК-(I\*) соответственно до гидролиза РНКазой Н, а на дорожке 7 — 16S рРНК, инкубированной с 0,05 мкг РНКазы Н в отсутствие олигонуклеотида. Эти данные свидетельствуют о том, что множественное расщепление 16S рРНК в составе ковалентных аддуктов с реагентами (I\*) и (II\*) — следствие алкилирования 16S рРНК этими реагентами в различных комплексах, а не результат неспецифического гидролиза следами нуклеаз.

На рис. 3 представлено разделение в 6% ПААГ продуктов гидролиза 16S рРНК РНКазой Н в составе комплекса с олигонуклеотидом (I) (дорожка 3) и в составе ковалентного аддукта 16S РНК-(I\*) (дорожка 4, степень модификации 16S рРНК реагентом (I\*),  $\alpha = 0,75$ ) после введения  $^{32}\text{P}$ -радиоактивной метки по 3'-ОН-группе образующихся фрагментов с помощью РНК-лигазы и  $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{pCr}$ . Расщепление 16S рРНК в составе гетеродуплекса с (I) происходит по единственному участку с образованием фрагмента длиной около 40 нуклеотидов и укороченной 16S рРНК, все остальные фрагменты — результат неспецифического гидролиза РНК нуклеазными примесями в процессе всех реакций и обработок (см. дорожки 1 и 2). В то же время при расщеплении ковалентного аддукта 16S рРНК с реагентом (I\*) происходит образование нескольких фрагментов. В этом случае, как и при расщеплении комплементарного комплекса 16S рРНК с (I), появляются дополнительные фрагменты за счет неспецифического гидролиза 16S рРНК (контроль без обработки РНКазой Н приведен на дорожке 5).

Электрофоретическая подвижность единственного фрагмента, получившегося в результате расщепления гетеродуплекса 16S рРНК·(I), относительно бромфенолового синего ( $E_f$ ) совпадает с  $E_f$  для группы из четырех фрагментов (рис. 3, 3), получающихся при расщеплении ковалентного аддукта 16S РНК-(I\*), и составляет 0,845 для комплекса и 0,803—0,850 для ковалентного аддукта.

Ранее при исследовании сайт-направленного алкилирования 16S рРНК реагентами (I\*) и (II\*) [12] было обнаружено, что стехиометрия ковалентного присоединения реагентов (I\*) и (II\*) к 16S рРНК превышает единицу. На основании анализа кинетических параметров комплементарно адресованной модификации 16S рРНК этими реагентами было сделано предположение об алкилировании 16S рРНК как в совершенных, так и в несовершенных комплексах с реагентами (I\*) и (II\*). Результаты расщепления цепи РНК в ковалентных аддуктах с реагентами (I\*) и (II\*) в совокупности с результатами гидролиза 16S рРНК в гетеродуплексе с олигонуклеотидами (I) и (II) подтверждают существование таких несовершенных комплексов: расщепление 16S рРНК в составе ковалентных аддуктов с реагентами (I\*) и (II\*) происходит не только по последовательностям 1498—1506 и 772—788, но и по ряду других участков РНК. Поскольку в 16S рРНК нет других участков, полностью комплементарных реагентам (I\*) и (II\*), можно заключить, что во всех других случаях реализуются несовершенные комплексы, в которых происходит алкилирование 16S рРНК.

В работах [18, 19] было показано, что сайтом узнавания РНКазы Н является гетеродуплекс, содержащий 3—4 пары оснований, однако тетрадезоксирибонуклеотиды оказались малоэффективными для направленного гидролиза матрицы с помощью РНКазы Н вследствие низкой стабильности образующихся гетеродуплексов. Более эффективное расщепление молекулы РНК достигается с использованием гексадезоксирибонуклеоти-

дов [19]. В настоящее время развиваются подходы к сайт-направленному гидролизу РНК с помощью РНКазы Н, основанные на использовании длинных, 18—20-звенных, рибоолигонуклеотидов, образующих прочные комплексы с РНК и содержащих три- или тетрадезоксирибонуклеотидную вставку на 3'-конце или в середине адреса [20, 21]. Следовательно, несмотря на то что сайтом узнавания РНКазы Н является гетеродуплекс, содержащий 3—4 пары оснований, стабильность комплекса матрица·олигонуклеотид имеет определяющее значение для успешного гидролиза цепи РНК с помощью РНКазы Н. В том случае, когда гидролизу РНКазой Н подвергается ковалентный аддукт, образующийся в результате сайт-направленной модификации 16S рРНК одним из реагентов, диссоциация гетеродуплекса отсутствует вследствие ковалентной связи между модифицированным основанием в РНК и олигонуклеотидной частью реагента. Иными словами, в ковалентном аддукте происходит стабилизация гетеродуплексов, как совершенных, так и несовершенных, за счет алкилирования. Именно по этой причине цепь РНК в составе таких ковалентных аддуктов эффективно расщепляется РНКазой Н.

Таким образом, полученные нами данные позволяют заключить, что при комплементарно адресованной модификации 16S рРНК бензилиденowymi производными олигодезоксирибонуклеотидов происходит алкилирование РНК как в совершенных, так и в несовершенных дуплексах с реагентом; малопрочные несовершенные комплексы 16S рРНК с бензилиденowymi производными олигодезоксирибонуклеотидов значительно стабилизируются ковалентной связью между модифицированным основанием в РНК и олигонуклеотидной частью реагента, что обеспечивает расщепление молекулы рРНК с помощью РНКазы Н в составе таких ковалентных аддуктов. Данный подход может быть использован для оценки комплементационной точности сайт-направленной модификации высокомолекулярных РНК.

### Экспериментальная часть

В работе использовали 30S субчастицы рибосом *E. coli*, любезно предоставленные С. В. Кирилловым, В. И. Махно (ЛИЯФ); РНКазу Н (*E. coli*), любезно предоставленную Н. В. Чичковой (МГУ, лаб. им. Белозерского); препарат poly(dT), любезно предоставленный Г. А. Невинским; Т4-РНК-лигазу (36 000 ЕА/мл), ДНК-зависимую РНК-полимеразу (6 мг/мл) *E. coli* (НПО «Фермент», Вильнюс); 3',5'-цитидин[5'-<sup>32</sup>P]дифосфат (<sup>32</sup>Pср) с удельной активностью 40 ПБк/моль отечественного производства; [8-<sup>14</sup>C]аденозинтрифосфат (ЧССР), изотопно разбавленный до удельной активности 1,6 МБк/мкмоль; <sup>14</sup>C-меченый 4-(N-метил-N-(2-хлорэтил)амино)бензальдегид синтезирован как описано в работе [4]; все остальные реактивы — препараты фирм Merck, Fluka, Serva (ФРГ).

Синтез poly([<sup>14</sup>C]rA) проводили с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы, как описано в работе [22], используя в качестве матрицы poly(dT). Реакционную смесь (2,5 мл), содержащую 12 мкг poly(dT), 40 мМ трис-HCl (рН 7,9), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мМ EDTA, 0,4 мМ KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, 0,1 мМ дитиотреит, 0,25 мМ [<sup>14</sup>C]АТР, 120 мкг РНК-полимеразы, инкубировали 45 мин при 37° С. За протеканием реакции следили по включению <sup>14</sup>C-метки в кислотонерастворимую фракцию (включилось 32% метки). Реакцию останавливали добавлением EDTA до 10 мМ, проводили фенольную экстракцию, синтезированный комплекс осаждали этанолом. От не вступившего в реакцию АТР освобождали с помощью четырех последовательных переосаждений этанолом из 0,3 М ацетата натрия. Затем комплекс растворяли в воде, добавляли 250 мкг poly(dT) и эквимольное количество poly(rA). Полученный препарат poly(dT)·poly([<sup>14</sup>C]rA) с концентрацией 100 мкг/мл и удельной активностью 1·10<sup>8</sup> имп/мин·мг хранили при —50° С.

Активность РНКазы Н определяли в трех буферных системах: (см. рис. 1): 10 мМ трис-HCl (рН 7,9), 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,15 М NaCl, 0,2 мМ дитиотреит (А); 20 мМ трис-HCl (рН 7,9), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 М KCl, 0,2 мМ дитиотреит (Б); 50 мМ трис-HCl (рН 7,9), 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,35 М KCl, 0,2 мМ

дитиотреит ( $\text{TMK}_{350}$ ). Реакционная смесь (100 мкл) содержала 0,2 мкг  $\text{poly}([^{14}\text{C}]\text{rA})\cdot\text{poly}(\text{dT})$ . Перед добавлением РНКазы Н во всех экспериментах проводили отжиг комплекса  $\text{poly}([^{14}\text{C}]\text{rA})\cdot\text{poly}(\text{dT})$  (инкубация в течение 3 мин при 60° С и затем медленное охлаждение в течение 1 ч до 20° С). Затем добавляли 1 мкл раствора РНКазы Н (исходный препарат (0,5 мг/мл) или препарат, разбавленный в 5—100 раз буфером, в котором проводится реакция). Аликвоты из реакционной смеси (10 мкл) наносили на диски FN 16, пропитанные 10% трихлоруксусной кислотой (ТСА); диски отмывали  $4 \times 10$  мин в 5% ТСА при 0° С, затем 5 мин этанолом. Радиоактивность дисков определяли на счетчике Minibetta (LKB, Швеция).

*Синтез  $d(\text{pACCTTGTT})\text{rA}$  (I) и  $d(\text{pTTTGCTCCCC})\text{rA}$  (II), и их  $^{14}\text{C}$ -меченых бензилиденовых производных — реагентов (I\*) и (II\*) соответственно, а также характеристики этих реагентов подробно описаны в работах [12, 17].*

*Выделение 16S рРНК и ее комплементарно адресованную модификацию реагентами (I\*) и (II\*) проводили как описано в сообщении [12]. Алкилированную РНК отделяли от избытка реагента с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы 5—20% (10 mM трис-НСl (рН 7,4), 10 mM LiCl, 0,2% SDS) на центрифуге L8-M фирмы Beckman (ротор SW 40, 4° С, 36 000 об/мин, 17 ч). Фракцию 16S рРНК собирали (модифицированную РНК не отделяли от немодифицированной) и осаждали этанолом из 0,3 M ацетата натрия, рН 5,5. Целостность полученных препаратов модифицированной 16S рРНК определяли с помощью электрофореза в денатурирующем ПААГ так, как описано в работе [12]. Степень модификации рРНК определяли по количеству радиоактивности во фракции 16S рРНК. Были получены препараты ковалентных аддуктов (препараты модифицированной 16S рРНК) со степенями модификации ( $\alpha$ ) 0,58 и 0,75 для реагента (I\*) и 0,70 — для реагента (II\*).*

*Расщепление гетеродуплекса (16S рРНК·дезоксирiboолигонуклеотид) проводили в буфере Б при 20° С в течение 20 мин. Реакционная смесь (10 мкл) содержала 2,5 пмоль 16S рРНК (1,25 мкг), олигонуклеотиды (I) или (II) в количестве 2,5—250 пмоль и 0,1 мкл РНКазы Н. Перед добавлением РНКазы Н 16S рРНК и олигонуклеотид подвергали отжигу, как описано выше. Гидролизат анализировали с помощью денатурирующего электрофореза в 6% ПААГ ( $20 \times 25 \times 0,04$  см) при напряжении 50 В/см. РНК в геле окрашивали 0,4% метиленовым синим в 50% метаноле с 7,5% уксусной кислотой. В тех случаях, когда после расщепления РНКазой Н проводили мечение фрагментов РНК, гель радиоавтографировали на рентгеновскую пленку РМ-1 с усиливающим экраном.*

*Гидролиз ковалентных аддуктов 16S рРНК-(I\*) или 16S рРНК-(II\*) с помощью РНКазы Н проводили в буфере Б при 20° С в течение 20 мин. Реакционная смесь содержала 9 мкл буфера Б, 2,5 пмоль ковалентного аддукта, 1 мкл (0,05 мкг) РНКазы Н. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2%  $\text{LiClO}_4$  в ацетоне. Осадок гидролизованного ковалентного аддукта использовали затем для введения  $^{32}\text{P}$ -метки. Меченые фрагменты анализировали электрофорезом в 6% ПААГ, как описано ранее.*

*Введение  $^{32}\text{P}$ -метки по 3'-концу 16S рРНК и продуктов гидролиза РНКазой Н осуществляли по методу [23]. Для максимального введения радиоактивной метки в продукты гидролиза РНКазой Н использовали 50-кратный по отношению к 16S рРНК избыток  $^{32}\text{P}$ Ср; для уменьшения неспецифической деградации РНК нуклеазными примесями, имеющимися в препарате Т4-РНК-лигазы, реакцию проводили 18 ч в присутствии 0,02% бентонита при 4° С.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гринева Н. И. // Аффинная модификация биополимеров / Ред. Кнорре Д. Г. Новосибирск: Наука, 1983. С. 187—211.
2. Кнорре Д. Г. // Молекуляр. биология. 1977. Т. 11. Вып. 4. С. 1304—1310.
3. Карпова Г. Г. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1987. Вып. 4. С. 82—95.
4. Knorre D. C., Vlassov V. V., Zarytova V. F., Karpova G. G. // Advances in Enzyme Regulation. V. 24 / Eds Weber G. Oxford — N. Y. — Toronto — Sydney — Frankfurt: Pergamon Press, 1986. P. 277—300.

5. Summerton J. // J. Theor. Biol. 1979. V. 78. № 1. P. 77—89.
6. Кнорре Д. Г., Власов В. В. // Вестн. АН СССР. 1983. № 12. С. 74—81.
7. Гринев Н. И. // Вестн. АМН СССР. 1981. № 2. С. 83—93.
8. Бросалина Е. Б., Власов В. В., Кутявин И. В., Мамаев С. В., Плетнев А. Г., Подыминов М. А. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 240—247.
9. Власов В. В., Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Мамаев С. В., Подуст Л. М., Федорова О. С. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1221—1229.
10. Гимаутдинова О. И., Горшкова И. И., Грайфер Д. М., Карпова Г. Г., Кутявин И. В. // Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. Вып. 6. С. 1419—1423.
11. Гимаутдинова О. И., Горн В. В., Горшкова И. И., Грайфер Д. М., Карпова Г. Г., Мундус Д. А., Теплова Н. М. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 490—498.
12. Горшкова И. И., Зенкова М. А., Карпова Г. Г., Левина А. С., Соловьев В. В. // Молекуляр. биология. 1986. Т. 20. Вып. 4. С. 1084—1096.
13. Stepanova O. B., Metele V. G., Chichkova N. V., Smirnov V. D., Rodionova N. P., Atabekov I. A., Bogdanov A. A., Shabarova Z. A. // FEBS Lett. 1979. V. 103. № 1. P. 197—199.
14. Метелев В. Г., Степанова О. В., Чичкова Н. В., Смирнов В. Д., Родионова Н. П., Берзинь В. М., Янсонс И. В., Грен Э. Я., Богданов А. А., Атабеков И. Г. // Молекуляр. биология. 1980. Т. 14. Вып. 1. С. 200—210.
15. Гайда Г. З., Колосов М. И., Чичкова Н. В., Богданов А. А. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 5. С. 678—683.
16. Noller H. F., Wces C. R. // Science. 1981. V. 212. № 4493. P. 403—411.
17. Зенкова М. А., Карпова Г. Г., Левина А. С. // Молекуляр. биология. 1987. Т. 21. Вып. 4. С. 1130—1136.
18. Donnis-Keller H. // Nucl. Acids Res. 1979. V. 7. № 1. P. 179—192.
19. Mankin A. S., Skripkin E. A., Chichkova N. V., Kopylov A. M., Bogdanov A. A. // FEBS Lett. 1981. V. 131. № 2. P. 253—256.
20. Метелев В. Г., Крынецкая И. Ф., Заякина Г. В., Родионова Н. П., Тюлькина Л. Г., Атабеков К. И., Карпова О. В., Атабеков И. Г., Шабарова З. А. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 10. С. 1425—1427.
21. Shibahara S., Mukai S., Nishihara T., Inoue H., Ohtsuka E., Morisawa H. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 11. P. 4403—4415.
22. Van Kreijl C. F., Borst P. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1973. V. 54. № 1. P. 17—24.
23. Tyulkina L. G., Mankin A. S. // Anal. Biochem. 1984. V. 138. № 2. P. 285—290.

Поступила в редакцию  
7.VII.1989

После доработки  
20.XI.1989

M. A. ZENKOVA, G. G. KARPOVA, A. S. LEVINA

# THE RNase H DIGESTION OF THE ADDRESSED ALKYLATED, WITH DERIVATIVES OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES, 16S rRNA AT THE REAGENT'S BINDING SITES

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

It is demonstrated that 16S rRNA, complementary-addressed labelled with 2',3'-O-[4-N-methyl-N-(2-chloroethyl)-amino]benzylidene derivatives of oligonucleotides d(pACCTTGTT)rA and d(pTTTGCTCCCC)rA, can be cleaved by RNase H within the adducts, resulted from the modification. Comparative study of the 16S rRNA cleavage with RNase H within the above — mentioned covalent adducts, on the one hand, and within heteroduplexes with the same oligodeoxyribonucleotides, on the other, showed that (i) the complementary-addressed modification proceeds both in perfect and non-perfect complexes; (ii) 16S rRNA is cleaved by RNase H within both perfect and non-perfect complexes resulted from the alkylation, non-perfect complexes being considerably stabilized by the covalent bond between the reagent and the RNA; (iii) non-perfect complexes of 16S rRNA with the free oligodeoxyribonucleotides are unstable even at the high oligonucleotide concentration, so that no cleavage of 16S rRNA in such duplexes is observed. The approach based on cleavage of RNA within covalent adducts resulted from the complementary-addressed RNA modification may be used for fragmentation of RNA molecule in the addressed reagent's binding site.