



УДК 547.78 + 547.963.3

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ N,N'-ТИОНИЛДИИМИДАЗОЛА
ДЛЯ МЕЧЕНИЯ 5'-КОНЦЕВЫХ ФОСФОМОНОЭФИРНЫХ ГРУПП РНК
[³²P]ОРТОФОСФОРНОЙ КИСЛОТОЙ

Пиотровский Л. Б., Киселев О. И.

*Институт экспериментальной медицины
Академии медицинских наук СССР, Ленинград*

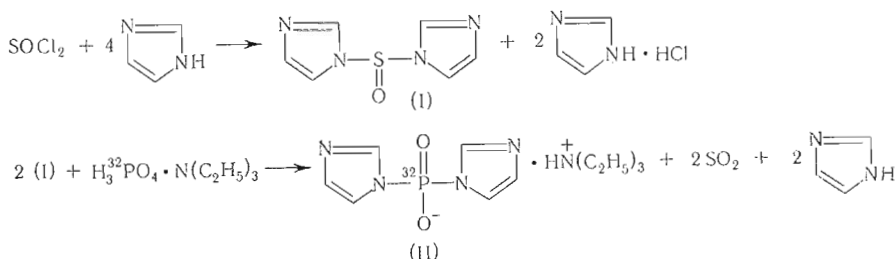
Для получения [³²P]димидазолилфосфината, избирательно фосфорилирующего фосфомоноэфирные 5'-концы РНК, вместо N,N'-карбонилдимидазола использован более реакционноспособный N,N'-тионилдимидазол. С помощью [³²P]димидазолилфосфината получены меченые по 5'-концевым фосфомоноэфирным группам 28S-рРНК и суммарная цитоплазматическая РНК печени крысы. Установлено, что ³²P-меченая фосфатная группа ковалентно присоединяется в фосфорилированных концах рРНК и может быть удалена щелочной фосфатазой. В составе суммарной цитоплазматической РНК эффективно фосфорилировались четыре класса РНК: 28S-, 18S-, 5S-рибосомальные РНК и 4S-тРНК. Хроматографией на poly(U)-сефарозе показано, что не более 1% poly(A)-содержащей мРНК имеет моноэфирные концевые группы.

Методы химического и ферментативного введения метки в концевые нуклеотиды широко используются при исследовании структуры нуклеиновых кислот. Так, введение трития в 3'-концевые нуклеотиды РНК применяется для определения природы концевых нуклеотидов, внутримолекулярной локализации гомополинуклеотидных последовательностей, в частности poly(A) [1], для изучения первичной структуры олигонуклеотидов и тРНК [2]. При введении радиоактивной метки в 5'-концевые нуклеотиды РНК используются фосфатазно-полинуклеотидкиназный метод [3, 4] и метод с использованием 2-цианэтилфосфата [5—7]. Оба метода позволяют присоединять к 5'-концевым гидроксилам РНК ³²P-меченую фосфатную группу. Значительный интерес представляет метод Рапапорта и Замечника [8], с помощью которого можно получать РНК, избирательно меченные радиоактивным фосфором по фосфорилированным 5'-концам. Активным действующим началом в этом случае является димидазолилфосфинат, способный присоединять остаток фосфорной кислоты к фосфомоноэфирной группе [9, 10]. Метод может быть использован для введения радиоактивной метки в нуклеиновые кислоты при изучении биосинтеза и структуры прешественичков мРНК, активных форм мРНК и организации единиц транскрипции эукариотов [11, 12].

По методу [8] [³²P] димидазолилфосфинат получают взаимодействием N,N'-карбонилдимидазола с трибутиламолиевой солью [³²P]ортофосфорной кислоты. Мы предлагаем модификацию этого метода, которая состоит в замене N,N'-карбонилдимидазола на N,N'-тионилдимидазол. В широком ряду конденсирующих агентов имидазольного типа N,N'-тионилдимидазол представляет собой наиболее реакционноспособное соединение [13, 14]. При многостадийном химическом процессе, каковым

является введение радиоактивного остатка фосфорной кислоты в РНК, использование на отдельных стадиях более активных реагентов может существенно отразиться на выходе соответствующих продуктов. В результате реакции ортофосфорной кислоты с N,N'-карбонилдимидазолом образуется димидазолилфосфинат и менее реакционноспособный моноимидазолилфосфонат [15, 16]. Использование более активного N,N'-тионилдимидазола должно привести к увеличению выхода димидазолилфосфината и, как следствие, к более эффективному введению метки в РНК. Кроме того, учитывая, что димидазолиды — неустойчивые, легко гидролизующиеся соединения, желательнее применение свежеприготовленных реактивов. Получение N,N'-тионилдимидазола является относительно простой в обычной лабораторной практике процедурой, тогда как для синтеза N,N'-карбонилдимидазола необходимо использование фосгена.

N,N'-Тионилдимидазол (I) получен при взаимодействии хлористого тионила с имидазолом в безводном тетрагидрофуране [17] и без выделения использован для синтеза $[^{32}\text{P}]$ димидазолилфосфината (II) в реакции с триэтиламмониевой солью $[^{32}\text{P}]$ ортофосфорной кислоты в безводном диметилформамиде:



Фосфорилирование 5'-концевых фосфоэфирных групп триэтиламмониевой соли РНК проводилось соединением (II) при комнатной температуре в течение 12 ч:



Нами фосфорилировались препараты 28S-pРНК и суммарной цитоплазматической РНК печени крысы. Очистка РНК проводилась выделением ее литиевой соли, диализом и центрифугированием в градиенте Cs_2SO_4 в 10%-ном диметилсульфоксиде [18].

На рис. 1 видно, что 28S-pРНК распределяется в виде гомогенной полосы с плавучей плотностью $\sim 1,57$ г/мл. Нерadioактивная РНК, добавленная в качестве носителя, концентрировалась в этой же зоне в виде белой полосы. Доказательством образования ковалентной связи радиоактивного остатка фосфорной кислоты с фосфатными группами концевых нуклеотидов может служить чувствительность метки к щелочной фосфатазе [19]. Результаты, представленные в таблице, показывают, что как

Анализ продуктов гидролиза ^{32}P -меченых 28S-pРНК и суммарной цитоплазматической РНК рибонуклеазой А и щелочной фосфатазой

Фермент	Исходная РНК		Фракции после инкубации, имп/мин	
	тип	имп/мин	кислотонерастворимая	кислоторастворимая
Рибонуклеаза А	28S-pРНК	10 879	714	9 112
Щелочная фосфатаза	»	12 356	538	11 072
Рибонуклеаза А	Суммарная РНК	24 356	1642	21 379
Щелочная фосфатаза	То же	22 326	1232	20 089

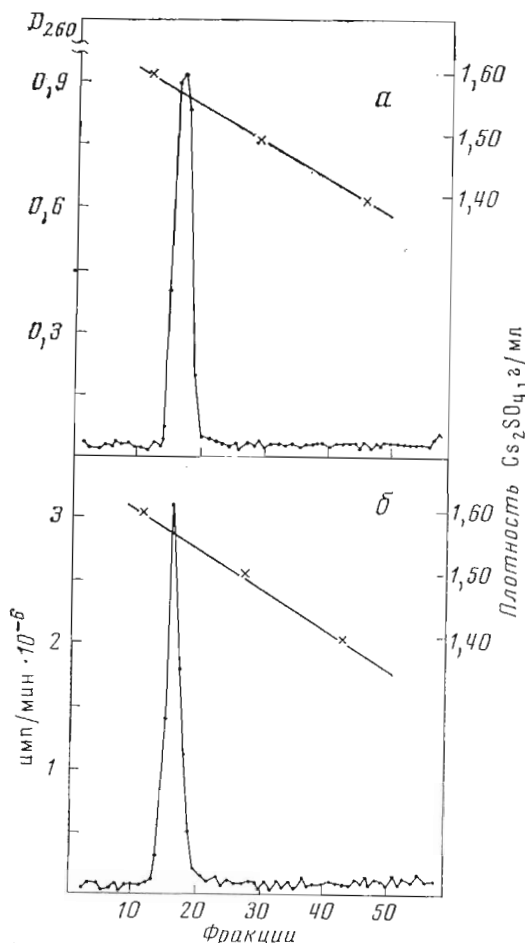


Рис. 1. Ультрацентрифугирование немеченой 28S-рРНК (а) и 28S-[³²P]рРНК (б) в градиенте концентрации сульфата цезия в 10%-ном диметилсульфоксиде

щелочная фосфатаза, так и рибонуклеаза А почти полностью переводят радиоактивный фосфат в кислоторастворимую фракцию.

[³²P]РНК анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле [20]. 28S-[³²P]рРНК (рис. 2,а) не содержала компонентов, которые можно было бы принять за продукты деградации, и не отличалась от интактной 28S-рРНК по электрофоретической подвижности. Меченая суммарная цитоплазматическая РНК включала в себя четыре основных радиоактивных компонента: 28S-, 18S-, 5S и 4S-РНК (рис. 2,б). Только незначительная радиоактивность обнаруживается во фракциях полидисперсных РНК.

Нами была предпринята попытка выделения poly(A)-содержащей мРНК из суммарной меченой цитоплазматической РНК. При содержании мРНК (по данным связывания с poly(U)-сефарозой) ~1,8% меченые мРНК составляли только 0,005% общей активности (рис. 3,а, б). Учитывая, что размеры мРНК в среднем значительно меньше размеров 28S-рРНК, можно было ожидать существенного увеличения доли poly(A)-содержащих мРНК в равномерно меченых препаратах суммарной РНК цитоплазмы. Значительный избыток рРНК в суммарной РНК не отразился, вероятно, на эффективности фосфорилирования мРНК, о чем свидетельствует высокая удельная радиоактивность 5S- и 4S-РНК (рис. 2,б). Ис этих данных

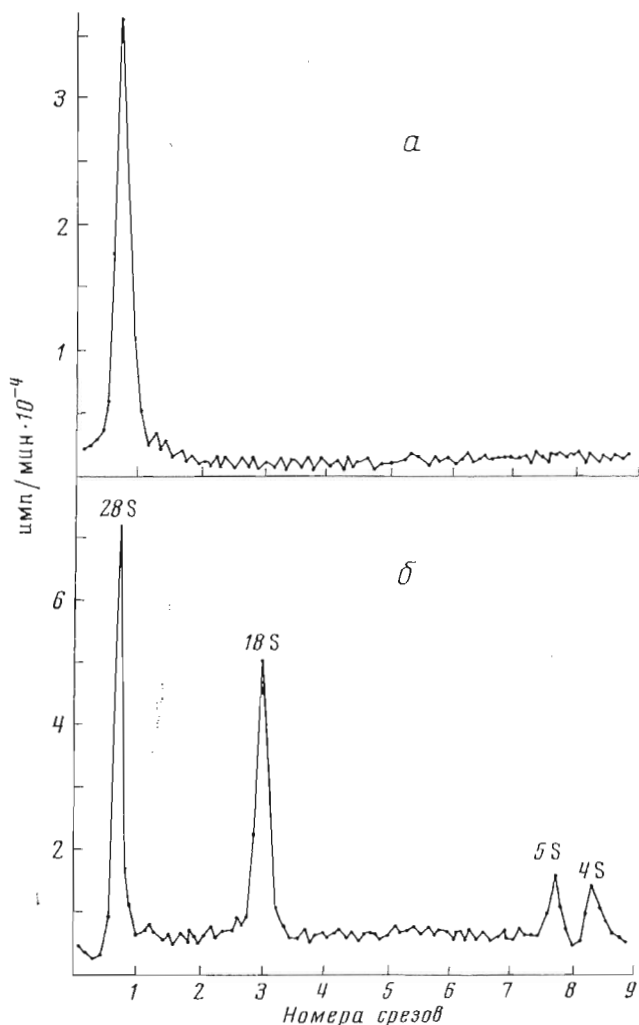


Рис. 2. Анализ 28S- $[^{32}\text{P}]$ pРНК (а) и суммарной цитоплазматической $[^{32}\text{P}]$ РНК (б) с помощью электрофореза в полиакриламидном геле

можно сделать вывод, что poly(A)-содержащие мРНК или не имеют моноэфирных фосфатных группировок на 5'-концах, или их содержание крайне невелико и сравнимо с возможной долей деградированных молекул. Этот вывод подтверждается результатами последних исследований структуры 5'-концевых участков мРНК животных и вирусов [21—23]. Установлено, что 5'-концевые последовательности мРНК животных и вирусов не содержат свободных фосфатных групп и имеют структуру $m^7G5'ppp5'NmpNpNp\dots$ [21, 23]. m^7G своей 5'-гидроксильной группой ковалентно связан с 5'-концевым нуклеотидом мРНК через трифосфат. Эта модификация происходит посттранскрипционно и является завершающей стадией процессинга мРНК. Проверка высказанного предположения возможна с помощью описанного метода в применении его к изучаемой мРНК после ее периодатного окисления и β -элиминирования концевого 7-метилгуанина.

В заключение следует отметить, что фосфорилирование 5'-концевых фосфомоноэфирных групп нуклеиновых кислот димидазолилфосфинатом может применяться для решения различных вопросов, где необходим анализ 5'-концевых последовательностей нуклеиновых кислот. Сущест-

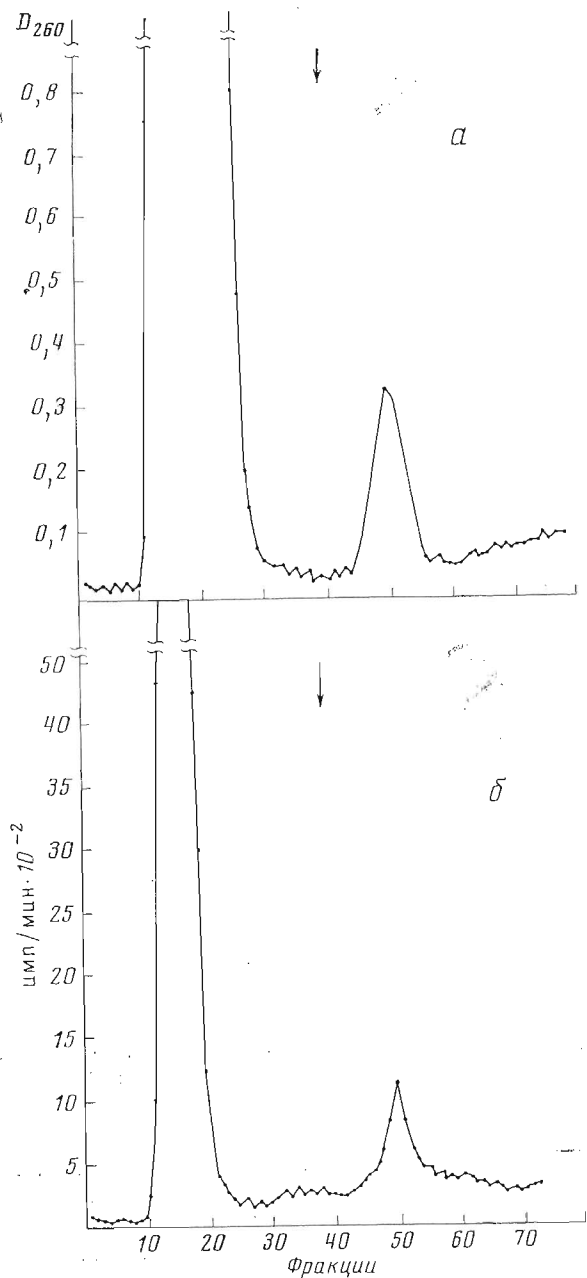


Рис. 3. Хроматография суммарной немеченой (а) и меченой (б) цитоплазматической РНК на poly(U)-сефарозе. Стрелкой показано начало элюции буфером, содержащим 60% формамида

венный интерес представляет исследование структуры 5'-концевых последовательностей гетерогенной ядерной РНК и организации проксимальной части единиц транскрипции эукариотов [42]. Диимидазолил-фосфинат может быть использован также как конденсирующий агент для присоединения синтетических и природных полинуклеотидов к твердым носителям. Возможности применения метода и структура 5'-концов мРНК исследуются нами в настоящее время.

Центрифугирование проводили на ультрацентрифуге «Spinco L2 65B» фирмы «Beckman» (США). УФ-поглощение регистрировали на спектрофотометре «Hitachi», модель 356 (Япония), используя самодельную проточную кювету. Радиоактивный материал обсчитывали на сцинтилляционном счетчике «Mark II» фирмы «Nuclear Chicago» (США), используя жидкостный толуольный сцинтиллятор, содержащий 15 г 2,5-дифенилоксазола и 50 мг 1,4-бис-[2-(4-метил-5-фенилоксазолил)]-бензола на 1 л толуола.

Суммарную РНК выделяли из постмитохондриального супернатанта по методу [24]. Для выделения 28S-рРНК суммарную РНК фракционировали в линейном градиенте концентрации сахарозы (5—20%-ный раствор в 0,05 М Na-ацетатном буфере, рН 5,5, в присутствии 2 mM раствора динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты). Все растворы обрабатывали диэтилпирокарбонатом [24]. РНК в объеме 0,5 мл наслаивали на градиент объемом 35 мл. Центрифугировали в роторе SW27 (25 000 об/мин, 15 ч, 4°). Градиент собирали фракциями объемом по 0,7 мл. УФ-поглощение регистрировали на спектрофотометре при 260 нм. Фракции, содержащие 28S-рРНК, объединяли и осаждали этанолом с 0,3 М LiCl. Удаление примеси poly(A)-содержащей мРНК осуществляли на колонке с poly(U)-сефарозой по методу, описанному в работе [25].

Получение триэтиламмониевой соли суммарной цитоплазматической и 28S-рРНК. РНК растворяли в бидистиллированной воде, обработанной диэтилпирокарбонатом, и пропускали через колонку с дауэксом 50w × × 2(H⁺), промытую водой. К элюату добавляли эквимолярное количество триэтиламина до нейтральной реакции раствора и лиофилизовали. Триэтиламмониевую соль РНК получали в виде слегка желтоватого масла, растворяли в безводном диметилформамиде и хранили в эксикаторе при 4°. Перед дальнейшей работой РНК проверяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле или седиментацией в градиенте концентрации сахарозы. Для этого аликвоты разводили вдвое 0,6 М раствором LiCl, осаждали РНК двумя объемами охлажденного этанола, растворяли осадок в Na-ацетатном буфере (0,05 М, рН 5,5) и наслаивали на градиент.

Приготовление триэтиламмониевой соли [³²P]ортофосфорной кислоты. К водному раствору 0,1 мг H₃³²PO₄ (уд. акт. 15 Ки/ммоль) добавляли 0,15 мг триэтиламина (полуторный избыток), отгоняли в вакууме воду, добавляли 3 мг безводного диметилформамида, отгоняли растворитель в вакууме и повторяли эту процедуру дважды.

Получение N,N'-тионилдиимидазола (I). К раствору 275 мг имидазола в 2 мл безводного тетрагидрофурана прибавляли на холоду 0,072 мл свеженеперегнанного хлористого тионила. Реакционную смесь оставляли на 1 ч, затем тщательно отфильтровывали выпавший хлоргидрат имидазола и в дальнейшем использовали раствор (I) в тетрагидрофуране.

Получение [³²P]диимидазолилфосфината (II). К раствору 0,2 мг триэтиламмониевой соли [³²P]ортофосфорной кислоты в 3 мл безводного диметилформамида прибавляли 0,1 часть раствора (I) в безводном тетрагидрофуране (примерно 0,3—0,4 мл, 18,2 мг (I), 50-кратный избыток). Реакционную смесь оставляли на ночь. Для разрушения избытка N,N'-тионилдиимидазола добавляли 0,03 мл метанола и через 0,5 ч полученный раствор (II) использовали для введения метки в РНК.

Получение меченых препаратов суммарной цитоплазматической РНК и 28S-рРНК. К раствору [³²P]диимидазолилфосфината (II) приливали раствор 0,5 мг триэтиламмониевой соли РНК в 0,2 мл смеси диметилформамида с формамидом (1 : 1) и оставляли при комнатной температуре на ночь. Затем добавляли 6 М раствор LiCl до конечной концентрации 0,3 М и осаждали литиевую соль РНК охлажденным этанолом, центрифугировали, растворяли в формамиде и повторяли осаждение. Дальнейшую очистку РНК проводили диализом против буфера 0,05 М KH₂PO₄—0,05 М

лимонная кислота (рН 7,0) и центрифугированием в самоустанавливающимся градиенте концентрации Cs_2SO_4 в 10%-ном диметилсульфоксиде [18] в роторе Ti50(38 000 об/мин, 48 ч, 23°). Объем градиента 6 мл. Градиент собирали фракциями объемом по 0,1 мл. 28S-рРНК распределялась в виде гомогенной полосы с плавучей плотностью $\sim 1,575$ г/мл (рис. 1). Нерадиоактивная РНК, добавленная в качестве носителя, концентрировалась в этой зоне в виде белой полосы.

Электрофорез РНК проводили по методу работы [20] в трубках $0,6 \times 6$ см (5мА на 1 трубку) 2,5 ч в 2,5%-ном полиакриламидном геле (рис. 2). Контрольные гели окрашивались метиленовым синим. После электрофореза гели извлекали, разрезали и просчитывали радиоактивность в унисолве. Удельная радиоактивность очищенной 28S-[^{32}P]рРНК колебалась в различных опытах от $0,5 \cdot 10^4$ до $2 \cdot 10^4$ имп/мин·мкг.

Выделение poly(A)-содержащей мРНК. Суммарную цитоплазматическую РНК хроматографировали на poly(U)-сефарозе по методу работы [25] на колонке $0,5 \times 2$ см (рис. 3). Наносили РНК в 0,05 М трис-НСI-буфере (рН 7,2), содержащем 0,5 М NaCl и 4 мМ динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты. Элюция poly(A)-содержащей мРНК проводилась таким же буфером без NaCl с 60% формамида. При нанесении на колонку 2 мг суммарной цитоплазматической РНК выход poly(A)-содержащей мРНК $\sim 1,8\%$. При хроматографии суммарной цитоплазматической [^{32}P]РНК нанесено $12 \cdot 10^6$ имп/мин. Выход радиоактивной poly(A)-содержащей мРНК $\sim 0,005\%$ (см. рис. 3). Калибровку колонки проводили при хроматографии poly(A), которая элюировалась в линейном градиенте формамида в диапазоне 40—50% формамида.

Гидролиз рибонуклеазой А (КФ 2.7.7.16) и щелочной фосфатазой (КФ 3.1.3.1) [^{32}P]РНК. Гидролиз [^{32}P]РНК рибонуклеазой А проводили в 0,5М трис-НСI-буфере (рН 7,2), содержащем 50 мкг/мл фермента, при 37° в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением равного объема 10%-ной трихлоруксусной кислоты. Гидролиз [^{32}P]РНК щелочной фосфатазой, предварительно обработанной диэтилпирокарбонатом [24], проводили в 0,02 М трис-НСI-буфере (рН 8,2), содержащем 0,5 мМ $MgCl_2$ и 50 мкг/мл фермента, при 30° в течение 30 мин [19]. Активность щелочной фосфатазы определяли с *n*-нитрофенилфосфатом [26].

ЛИТЕРАТУРА

1. Rho H. M., Green M. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **71**, 2386—2390.
2. Randerath K., Chia L. S. Y., Gupta R. C., Randerath E., Hawkins E., Brum C. K., Chang S. H. (1975) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **63**, 157—163.
3. Takanami M. (1967) J. Mol. Biol., **23**, 135—148.
4. Silber R., Malathi V. G., Hurwitz I. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **69**, 3009—3013.
5. Pfitzner K. E., Moffatt I. G. (1964) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **17**, 146—149.
6. Han J., Han J. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **70**, 1355—1358.
7. Crippa M., Meza J., Dina D. (1974) Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., **38**, 933—942.
8. Rapaport E., Zamecnik P. C. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 314—317.
9. Hoard D. E., Ott D. G. (1965) J. Amer. Chem. Soc., **87**, 1785—1788.
10. Kozarich I. W., Chinault A. C., Hecht S. M. (1973) Biochemistry, **12**, 4458—4463.
11. Кутель У., Рысков А. П., Георгиев Г. П. (1971) Молекулярн. биология, **5**, 334—340.
12. Georgiev G. P., Ryskov A. P., Coutelle C., Mantieva V. L., Avakyan E. R. (1972) Biochim. et. biophys. acta, **259**, 252—283.
13. Staab H. A. (1962) Angew. Chem. Internat. Edit., **1**, 351—367.
14. Staab H. A., Wendel K. (1966) Lieb. Ann., **694**, 86—90.
15. Cramer F., Schaller H., Staab H. A. (1961) Chem. Ber., **94**, 1612—1620.
16. Schaller H., Staab H. A., Cramer F. (1961) Chem. Ber., **94**, 1621—1633.
17. Staab H. A., Wendel K. (1961) Angew. Chem., **73**, 26.
18. Williams A. E., Vinograd J. (1971) Biochim. et biophys. acta, **228**, 423—439.
19. Yogo J., Teng M.-H., Wimmer E. (1974) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **61**, 1101—1109.

20. Fessler A. C., Dingman C. W. (1967) *Biochemistry*, **6**, 1818—1827.
21. Perry R. P., Kelly D. E., Friderici K., Rottman F. (1975) *Cell*, **4**, 387—389.
22. Wel C.-M., Gershowitz A., Moss B. (1975) *Cell*, **4**, 379—386.
23. Faust M., Hasting K. E. M., Millward S. (1975) *Nucl. Acids Res.*, **2**, 1329—1343.
24. Palmiter R. D. (1974) *Biochemistry*, **13**, 3606—3615.
25. Molloy G. R., Darnell J. E. (1973) *Biochemistry*, **12**, 2324—2330.
26. Абросимова-Амельянчик Н. М., Аксельрод В. Д., Татарская Р. И. (1967) *Биохимия*, **32**, 240—247.

Поступила в редакцию
23.II.1975

После переработки
17.II.1976

THE USE OF N,N'-THIONYLDIIMIDAZOLE FOR LABELING OF RNA 5'-TERMINAL MONOESTER PHOSPHATE GROUPS WITH [³²P]ORTHOPHOSPHATE

PIOTROVSKY L. B., KISELEV O. I.

*Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical
Sciences of the USSR, Leningrad*

More reactive N,N'-thionyl diimidazole was used instead of N,N'-carbonyl diimidazole for the preparation of [³²P] diimidazolylphosphinate that selectively phosphorylates the monoester phosphate 5'-termini in RNA. With the aid of [³²P] diimidazolylphosphinate the labeled 5'-terminal monoester phosphate groups both in 28S rRNA and total cytoplasmic RNA were obtained. It was established that ³²P-phosphate groupings are covalently linked to the phosphorylated rRNA termini and can be removed by the alkaline phosphatase treatment. Only four classes of total cytoplasmic RNAs, i. e., 28S, 18S, as well as 5S rRNA and 4S tRNA were shown to be labeled by this procedure. Poly(U)-Sepharose chromatography revealed that no more than one per cent of poly(A)-rich mRNA contains the terminal monoester phosphate groups.
