



УДК 547.963.32.04:577.155

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАПРАВЛЕННОГО ГИДРОЛИЗА РНКазой Н
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КОНФОРМАЦИОННЫХ ПЕРЕХОДОВ
РИБОСОМНОЙ 16S РНК**

*Гайда Г.З., Спундэ А.Я., Скрипкин Е.А.,
Каграманова В.Б.,
Вейко В.П., Чичкова Н.В., Богданов А.А.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского*

Рибосомная 16S РНК *E. coli* гидролизовалась РНКазой Н в присутствии синтетических олигодезоксирибонуклеотидов. Образующиеся фрагменты анализировали с помощью электрофореза в 4% полиакриламидном геле. Картина фрагментации зависела от метода выделения РНК. 16S РНК, полученная фенольно-детергентным методом с добавлением EDTA, гидролизовалась в присутствии олигонуклеотида d(T-T-C-C-T-T-T-G-A) по связи 1152–1153 с образованием 390-членного 3'-концевого фрагмента. При более глубоком гидролизе происходил также разрыв по связи 301–302. 16S РНК, выделенная из 30S субчастиц рибосом с помощью экстракции белков уксусной кислотой в присутствии высоких концентраций ионов Mg^{2+} и мочевины, гидролизовалась только по связи 301–302. В присутствии олигонуклеотида d(C-C-T-G-T-C-T) обе формы 16S РНК гидролизовались с образованием одинаковых фрагментов по связи 1047–1048. Локализация мест разрывов проведена прямым определением нуклеотидной последовательности концевых участков фрагментов. Взаимные превращения двух форм 16S РНК при различных обработках и их поведение в системе реконструкции рибосомных 30S субчастиц *in vitro* позволили заключить, что появление 390-членного фрагмента свидетельствует о существенных конформационных изменениях в 3'-концевом районе, обусловленных глубокой денатурацией.

Недавно в нашей лаборатории был предложен новый метод направленной фрагментации высокополимерных РНК с помощью фермента РНКазы Н и синтетических олигодезоксирибонуклеотидов [1]. РНКаза Н, являясь гибридазой, разрушает РНК, находящуюся в комплементарном комплексе с цепью ДНК. Поскольку короткие олигодезоксирибонуклеотиды образуют комплементарные комплексы с доступными участками РНК, обработка таких комплексов ферментом приводит к появлению разрывов в цепи РНК. Места разрывов определяются специфичностью связывания олигонуклеотидов. Этот подход по позднее использован Донис-Келлер для фрагментации 5,8S рРНК дрожжей и РНК сателлитного вируса некроза табака [2]. Он применялся также для направленного расщепления РНК бактериофагов MS2 и R17 [3, 4], для изучения топографии доступных для связывания с олигонуклеотидами участков 16S РНК в составе 30S субчастиц рибосом *E. coli* [5, 6]. В более простом варианте с участием гомогенных олигодезоксирибонуклеотидов гидролиз РНКазой Н успешно использовался для удаления poly(A)-последовательностей глобиновой мРНК и РНК полиовируса, а также для разрушения poly(C)-трактов в РНК вирусов ящура и энцефаломиокардита [7–10].

Поскольку этот метод — в настоящее время единственный способ прямого определения места связывания олигодезоксирибонуклеотида с РНК [6], он, по-видимому, найдет широкое применение в функциональных исследованиях. Первая работа такого рода была опубликована Бакендорфом и др. [11].

Использованы следующие сокращения: РНП — рибонуклеопротеид, ПАГ — полиакриламидный гель, EDTA — натриевая соль этилендиаминтетраацетата, тридин — N-[три(оксиметил)метил]глицин, ТМК-буфер — буфер, содержащий 0,01 М трис-НСl (рН 7,5), 0,015 М $MgCl_2$, 0,37 М KCl.

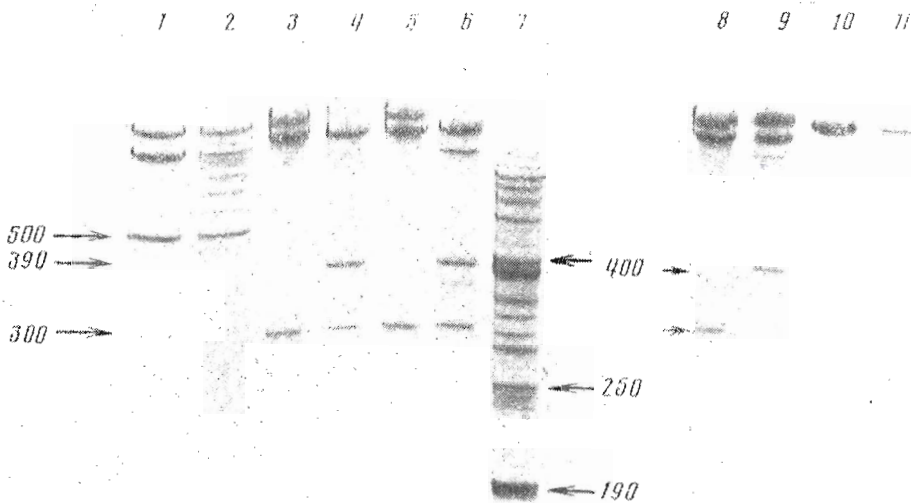


Рис. 1. Электрофоретическое разделение гидролизатов 16S РНК РНКазой Н в присутствии олигодезоксирибонуклеотидов d(T-T-C-C-T-T-G-A) (I) и d(C-C-T-G-T-C-T) (II). Каждый образец, содержащий 10 мкг 16S РНК, инкубировался с указанным количеством РНКазы Н при различных мольных соотношениях 16S РНК: олигонуклеотид (в скобках) при 4° С: 1-6 - в течение 60 мин, 8-11 - в течение 40 мин. Все образцы, кроме (3) и (4), инкубировались в стандартных солевых условиях; (3) и (4) - в ТМК-буфере. 1 - 16S РНК_ф, 0,3 мкл РНКазы Н, олигонуклеотид (II) (1:1); 2 - то же, но 16S РНК_у; 3 - 16S РНК_у, 1 мкл РНКазы Н, олигонуклеотид (I) (1,5:1); 4 - то же, но 16S РНК_ф; 5 - то же, что 3; 6 - то же, что 4; 8 - 16S РНК_у, 0,3 мкл РНКазы Н, олигонуклеотид (I) (3:1), 9 - то же, но 16S РНК_ф; 10 - 16S РНК_у, 1 мкл РНКазы Н; 11 - то же, но 16S РНК_ф; 7 - маркерная колонка, цифры указывают длину фрагментов

Для образования комплементарного комплекса с олигонуклеотидом необходимо, чтобы данный участок РНК не был вовлечен в сильные внутри- и межмолекулярные взаимодействия. Очевидно, что конформационные изменения, затрагивающие данный район и меняющие его доступность для связывания с олигонуклеотидом, должны непосредственно сказываться на картине гидролиза РНКазой Н. В данной работе этот эффект изучен на примере рибосомной 16S РНК *E. coli*.

Способность 16S РНК существовать в нескольких конформационно-стабильных состояниях в зависимости от метода ее выделения показана в ряде работ [12-15]. Конформеры различались по подвижности при электрофорезе в полиакриламидном геле (ПАГ) [13], поведению при хроматографии на колонках с метилированным альбумином на кизельгуре [12], чувствительности к РНКазам [14], способности взаимодействовать с рибосомными белками [14, 15]. В данной работе мы сравнивали 16S РНК, выделенные двумя разными методами: фенольно-детергентной депротенинизацией 30S субчастиц в растворе с низкой ионной силой в присутствии EDTA (16S РНК_ф) и депротенинизацией рибосом уксусной кислотой и мочевиной в растворе с высокой концентрацией ионов Mg²⁺ (16S РНК_у) [14]. Последний метод является, по-видимому, наиболее щадящим способом выделения рРНК, позволяющим максимально сохранить структурные особенности, присущие ей в нативном состоянии. В работе использовали синтетические олигодезоксирибонуклеотиды состава: I - d(T-T-C-C-T-T-G-A) и II - d(C-C-T-G-T-C-T). Для олигонуклеотида (I) нет точного комплементарного участка в нуклеотидной последовательности 16S РНК, однако существует несколько мест с достаточно протяженной частичной комплементарностью (5-8 пар). Олигонуклеотид (II) полностью комплементарен участку 16S РНК 1041-1048.

Выбирая условия гидролиза, мы учитывали то, что конформация РНК в растворе весьма чувствительна к изменениям ионного состава раствори-

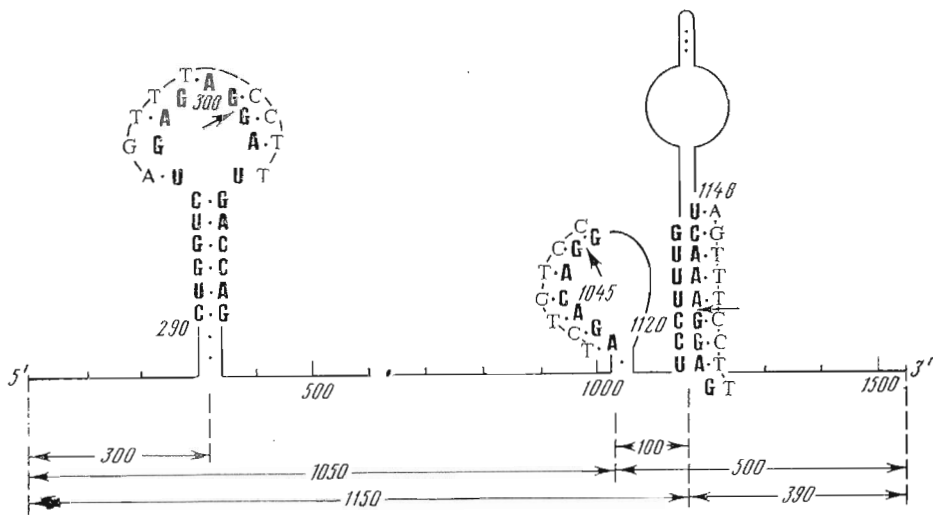


Рис. 2. Локализация точек разрыва в нуклеотидной последовательности 16S РНК

теля. Поэтому РНК гидролизовали в условиях (10 мМ трицин — NaOH (рН 8,0), 10 мМ MgCl₂, 0,2 М KCl, 0,1 мМ дитиотреит), в которых она имеет структуру, близкую по степени компактности к ее структуре в составе 30S субчастиц [16]. Картина гидролиза, получающаяся в этих условиях, принципиально не отличается от гидролиза в стандартном ТМК-буфере, применяемом для реконструкции 30S субчастиц, хотя степень гидролиза несколько увеличивается (рис. 1). За ходом фрагментации следили с помощью электрофореза в ПАГ в денатурирующих условиях. Глубину гидролиза меняли, варьируя время гидролиза, а также соотношения фермент — субстрат или олигонуклеотид — 16S РНК.

В присутствии олигонуклеотида (I) гидролиз начинался с появления единичного разрыва в 16S РНК_φ. В результате образовывался фрагмент длиной около 390 нуклеотидов и соответствующий ему высокомолекулярный фрагмент (рис. 1, полоса 9). Несколько позже появилась вторая пара фрагментов, меньший из которых содержал около 300 нуклеотидов. В этих же условиях начинался гидролиз 16S РНК_γ с образованием аналогичного 300-членного фрагмента (рис. 1, полоса 8). Разрыв с образованием 390-членного фрагмента характерен только для 16S РНК_φ и в случае 16S РНК_γ никогда не наблюдался (рис. 1). Углубление гидролиза ведет к появлению целого спектра дополнительных минорных полос и исчезновению высокомолекулярных фрагментов. Размеры фрагментов определялись по их электрофоретической подвижности в ПАГ. В качестве маркеров использовали гидролизат 16S РНК, полученный обработкой 30S субчастиц рибосом эндонуклеазой яда кобры [17] (рис. 1, полоса 7). Сравнение образующихся фрагментов РНК с маркерами позволяет достаточно точно определить их длину в области до 500 нуклеотидных остатков, где наблюдается линейная зависимость логарифмов молекулярных весов фрагментов от их подвижности.

Каждый из образующихся на начальной стадии гидролиза характерных фрагментов, по-видимому, возникает в результате точечного разрыва цепи 16S РНК. В таком случае они должны представлять собой ее 5'- и 3'-концевые фрагменты. Действительно, при анализе первичной структуры 16S РНК можно найти участки довольно хорошей комплементарности олигонуклеотиду (I) в районах 296—304 и 1148—1156 (рис. 2). Разрыв по первому из них должен привести к образованию примерно 300-членного 5'-концевого и по второму — 390-членного 3'-концевого фрагментов.

Обнаруженные нами различия в характере гидролиза двух форм 16S РНК отражают их конформационные различия, затрагивающие участки, непосредственно примыкающие к местам гидролиза. Интересно было оценить, как далеко распространяются эти различия, захватывают ли они всю

молекулу или локализованы в ограниченном районе. Мы повторили описанный выше эксперимент, взяв в качестве дезоксикомпонента олигонуклеотид (II). Для этого олигонуклеотида имеется строго комплементарный участок в районе 1042—1048 (рис. 2). Согласно всем опубликованным в настоящее время моделям вторичной структуры 16S РНК, а также данным, полученным нами при обработке РНКазой H целой 30S субчастицы в присутствии статистического набора олигодезоксирибонуклеотидов [5], этот район существует в виде открытой однотяжевой структуры. Разрыв по этому месту должен привести к образованию фрагмента длиной около 500 нуклеотидов. Как видно из рис. 1 (полосы 1 и 2), в результате гидролиза обеих форм 16S РНК в присутствии олигонуклеотида (II) действительно образуются фрагменты с ожидаемой подвижностью. Таким образом, конформационные различия между двумя формами 16S РНК не затрагивают района основного разрыва, индуцированного олигонуклеотидом (II). Во всяком случае он остается однотяжевым и экспонированным.

Необходимо отметить, что все полученные в этой работе разрывы скрыты и не проявляются до денатурации 16S РНК. Причем прочность скрепляющих их элементов структуры такова, что выявить разрывы удается лишь в 7 М мочеvine или после нагревания до 60°С. В сахарозном градиенте образцы 16S РНК, имеющие разрывы в 50% молекул, седиментируют неотличимо от контрольной интактной 16S РНК. Для точной локализации разрывов был проведен анализ нуклеотидной последовательности концов образующихся фрагментов. Продукты гидролиза РНКазой H несут фосфатную группу на 5'-конце и имеют свободный 3'-гидроксил. Таким образом, они представляют собой удобный объект для введения 3'-концевой метки с помощью ³²рСр и Т4-РНК-лигазы. В соответствии с этим место разрыва 16S РНК_φ в присутствии олигонуклеотида (I) определялось секвенированием 3'-концевого района 300-членного фрагмента, а соответствующее место разрыва 16S РНК_φ — секвенированием 3'-концевого района фрагмента, дополнительного к 390-членному (1150-членный фрагмент, рис. 2).

300-членный фрагмент был выделен в препаративных количествах электрофорезом в 8% ПАГ (соответствующая зона была локализована по УФ-поглощению с помощью флуоресцирующего экрана). Элвоированный из геля материал обрабатывали Т4-РНК-лигазой и ³²рСр. Благодаря небольшим РНКазным примесям в препарате РНК-лигазы произошла деградация фрагмента, в результате чего при последующем электрофорезе в 14% ПАГ получен целый спектр меченных по 3'-концу фрагментов. Три наиболее интенсивные полосы подвергнуты секвенированию по методике Петти [18]. Фрагменты, различаясь по длине, имели один и тот же 3'-конец, соответствующий разрыву между 301-м и 302-м нуклеотидами (таблица).

Аналогичным путем было показано, что 3'-конец 390-членного фрагмента совпадает с 3'-концом 16S РНК (данные не приведены). Для определения места разрыва, соответствующего 5'-концу этого фрагмента, определялась 3'-концевая нуклеотидная последовательность большого 1150-членного фрагмента после дополнительного гидролиза РНКазой H в присутствии олигонуклеотида (II). В результате последовательного гидролиза ожидалось образование фрагмента длиной примерно в 100 нуклеотидных остатков, ограниченного двумя разрывами (см. рис. 2). Использовались две схемы эксперимента. По одной из них вначале производился гидролиз в присутствии олигонуклеотида (II), 500-членный фрагмент выделяли в сахарозном градиенте и подвергали гидролизу в присутствии олигонуклеотида (I) (рис. 3). Продукты гидролиза после введения ³²Р-метки разделяли в 14% ПАГ и секвенировали (таблица, фр. 4—12). Вторая схема отличалась последовательностью гидролиза: сначала РНКазой H расщепляла комплекс 16S с олигонуклеотидом (I), затем с олигонуклеотидом (II). Соответственно из сахарозного градиента выделялся 1150-членный фрагмент, который затем гидролизовался в присутствии олигонуклеотида (II). Продукты гидролиза разделяли и секвенировали, как в первом случае (рис. 3, таблица, фр. 13, 14). Гидролиз по второй схеме был повторен также без промежуточного выделения большого фрагмента в сахарозном градиенте. В качестве контрольных препаратов использовали 16S РНК_φ, гидролизо-

Фрагменты 16S РНК, идентифицированные секвенированием

Источник выделения	Номер п.п.	Фрагменты, подвергнутые секвенированию *	Нуклеотидные последовательности вблизи мест разрывов и структура предполагаемых комплементарных комплексов с олигодезоксирибонуклеотидами **	
			вблизи 5'-конца фрагмента	вблизи 3'-конца фрагмента
Фрагмент «300»	1	100-301		d(A-G-T-T-T-C-C-T-T)
	2	200-301	
	3	280-301		-U-G-A-G-A-G-G-A-U-
100-членный фрагмент по схеме I	4	1480-1503	d(T-C-T-T-G-T-C-C)	
	5	1480-1504	d(A-G-T-T-T-T-C-C-T-T)
			-A-U-U-C-A-U-G-
			1476 ↑ 1482	-A-C-A-A-G-G-U-A-A-
	6	1505-1542	d(A-G-T-T-T-C-C-T-T)	
	7	1504-1542	
	8	1503-1542	-A-C-A-A-G-G-U-A-A-	
	9	1502-1542	1500 ↑↑↑↑ 1508	
	10 ***	~1410-1542	d(A-G-T-T-T-C-C-T-T)	
			
			-U-C-A-C-A-C-C-A-U-	
		1406 1414		
11	~1000-1046	d(A-G-T-T-T-C-C-T-T)		d(T-C-T-G-T-C-C)
	
		-U-C-C-A-C-G-G-A-A-		-A-G-A-C-A-G-G-
		999 } 1007		1042 ↑ 1048
12	438-497	d(A-G-T-T-T-C-C-T-T)		d(T-C-T-G-T-C-C)
	
		-G-U-A-A-A-G-U-A-C-		-C-C-G-C-A-G-A-A-G-
		428 ↑ 436		489 ↑ 497
100-членный фрагмент по схеме II	13	1000-1047	(см. [11])	d(A-G-T-T-T-C-C-T-T)
	14	~1080-1152	
				-U-C-A-A-A-G-G-A-G-
				1148 ↑ 1156
То же, без предварительного выделения 1150-членного фрагмента	15	~1080-1152	(см. [14])	d(T-C-T-G-T-C-C)
	16	~1004-1047	(см. [11])
	17	4-44		-C-C-G-C-A-G-G-
				40 ↑ 46

* Цифры обозначают положение с 5'-конца 16S РНК.

** Стрелки указывают место разрыва. Во фрагменте 11 место разрыва определено неточно.

*** Место разрыва не определено, приведена структура наиболее вероятного комплементарного комплекса.

ванные в присутствии каждого из олигонуклеотидов по отдельности. Из 14% геля вырезаны три полосы, отсутствующие в контрольных пробах (таблица, фр. 15-17).

Анализ полученных фрагментов привел к неожиданному результату. Среди фрагментов, образующихся при последовательном гидролизе 16S РНК₀, вначале в присутствии олигонуклеотида (II), затем олигонуклеотида (I) (схема I), не оказалось ни одного, соответствующего ожидаемому месту разрыва. Полученные фрагменты, очевидно, появились в результате гидролиза по минорным местам связывания олигонуклеотида (I). Основная их масса соответствовала 3'-концевому району 16S РНК. Мы предположили, что разрыв в области 1042-1048 и главным образом процедура

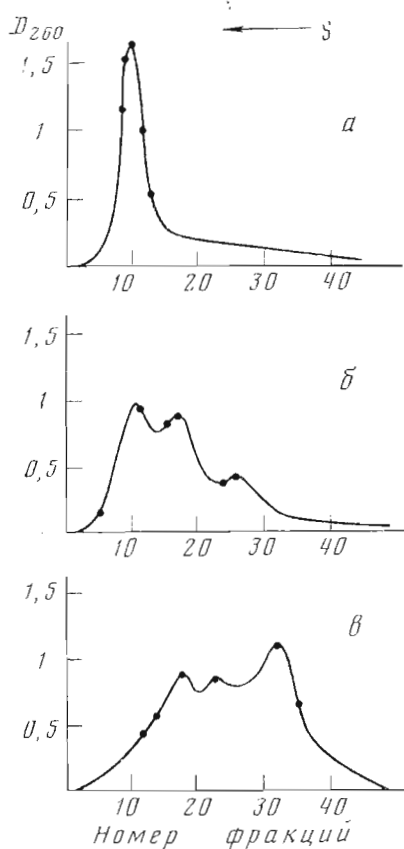
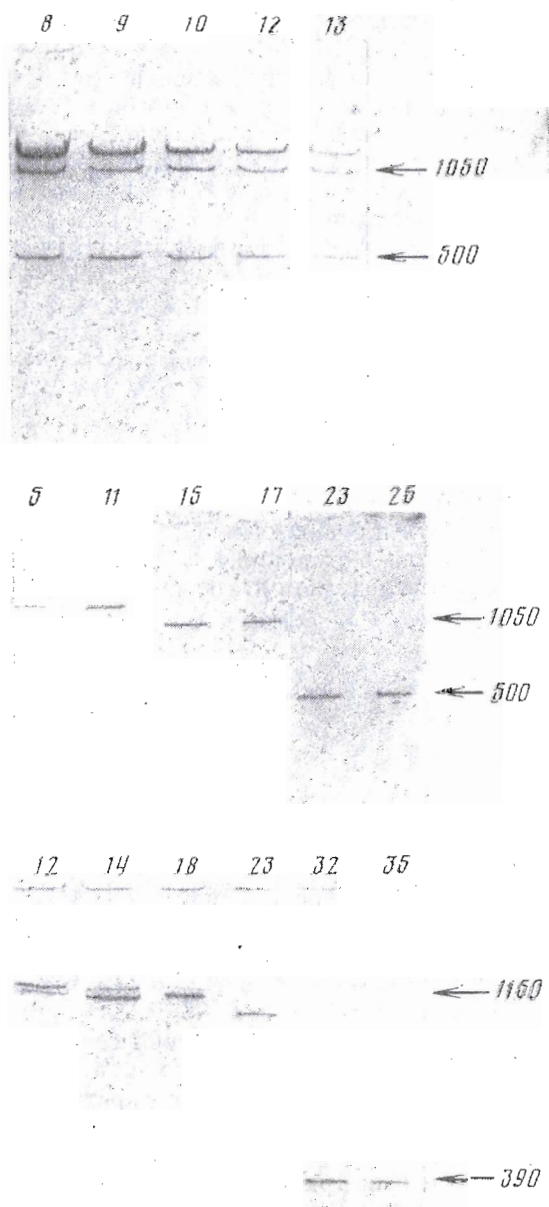


Рис. 3. Выделение 500-членного (*a*, *b*) и 1150-членного (*c*) фрагментов центрифугированием в сахарозном градиенте: *a* — разделение продуктов гидролиза 16S РНК_ф РНКазой Н, полученных в присутствии олигонуклеотида (II) (образец нанесен на градиент без предварительного прогрева); *b* — то же, но с предварительным прогревом образца в течение 3 мин при 70° С; *c* — разделение продуктов гидролиза 16S РНК_ф РНКазой Н, полученных в присутствии олигонуклеотида (I), с предварительным прогревом образца. Справа приведен электрофоретический анализ отдельных фракций градиента (фракции на профиле отмечены точками). Направление седиментации указано стрелкой



отделения 500-членного фрагмента от остальной части молекулы, требующая предварительной денатурации РНК, приводят к таким искажениям ее структуры, которые делают участок 1148—1156 недоступным для связывания олигонуклеотида. Действительно, при проведении гидролиза по схеме II были получены фрагменты, соответствующие ожидаемому месту разрыва (фр. 14 и 15). Таким образом, мы определили, что основное место гидролиза 16S РНК_ф в присутствии олигонуклеотида (I) лежит между 1152-м и 1153-м нуклеотидами.

Участок 1148—1156, гидролизующийся в 16S РНК_ф, в моделях, предложенных Ноллером и Воэе [19], а также страссбургской группой исследователей [20], вовлечен в образование шишечной структуры, наличие которой подтверждается также сравнительным филогенетическим анализом. Здесь омигодезоксирибонуклеотид должен конкурировать с внутренним спиральным участком РНК, состоящим из четырех А—U- и трех G—C-пар.

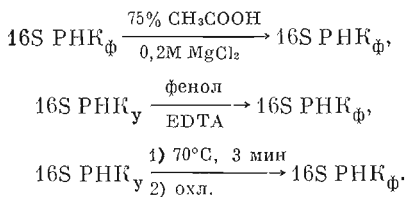
Вряд ли в этом случае можно предположить расплетание. Скорее всего этой шпильки не существует в структуре 16S РНК_ф. Появление 390-членного фрагмента в результате гидролиза 16S РНК_ф в присутствии олигонуклеотида (I) оказалось удобным тестом для оценки конформационного состояния РНК.

Различия между двумя формами 16S РНК, используемыми в работе, определяются методом выделения. Каждый из двух методов включает обработку такими небезразличными для пространственной структуры РНК агентами, как мочевина, высокие концентрации Mg²⁺, концентрированная уксусная кислота, фенол, EDTA. Важно было установить, в какой степени обнаруженные нами конформационные различия являются следствием воздействия соответствующих агентов.

С этой целью препараты 16S РНК_ф были подвергнуты обработкам, соответствующим всем стадиям выделения 16S РНК_у, и наоборот. Оказалось, что обработка уксусной кислотой в присутствии мочевины и 0,2 М MgCl₂ никак не влияет на картину гидролиза 16S РНК_ф, в то же время фенольная экстракция в присутствии EDTA переводила 16S РНК_у в форму, гидролизующуюся по типу 16S РНК_ф.

Различное поведение двух форм РНК при гидролизе может быть связано с их частичной денатурацией. Действительно, после 3 мин прогрева при 70° С с последующим резким охлаждением 16S РНК_у начинала гидролизываться с образованием 390-членного фрагмента.

Таким образом, взаимные превращения двух форм 16S РНК можно описать следующими соотношениями:



Отсюда можно предположить, что 16S РНК_ф представляет собой денатурированную форму. Денатурация связана с методом выделения и затрагивает, в частности, район 1148—1156, делая его доступным для связывания олигонуклеотида и взаимодействия с ферментом.

Наиболее важным критерием нативности рРНК является ее способность к взаимодействию с рибосомными белками с образованием субчастиц рибосом. Инкубация 16S РНК_у с суммарными белками 30S субчастиц в условиях реконструкции рибосом *in vitro* сопровождалась образованием 30S РНП-частиц, не отличимых от контрольных 30S субчастиц по седиментационному поведению на сахарозном градиенте (рис. 4а) и активности в *poly(U)*-зависимой системе синтеза полифенилаланина (данные не показаны). В случае 16S РНК_ф реконструкция доходила лишь до стадии 23S РНП-частиц (рис. 4б). По-видимому, структурные нарушения, привносимые фенольным методом выделения, настолько сильно искажают конформацию 16S РНК, что она становится «неузнаваемой» для белков в обычных условиях реконструкции. Неспособность к реконструкции строго коррелировала с появлением 390-членного фрагмента при гидролизе. На рис. 4в показано разделение гидролизатов 16S РНК, выделенных из разных фракций градиентов уксуснокислой экстракцией. Материал, выделенный из зоны 30S частиц, гидролизывался по типу 16S РНК_у, а 23S РНП содержали 16S РНК_ф.

В литературе описаны случаи, когда после денатурирующего воздействия нативную конформацию 16S РНК удавалось восстановить либо просто инкубацией в условиях реконструкции рибосом в отсутствие рибосомных белков, либо через реконструкцию целых 30S субчастиц. В нашем случае инкубация 16S РНК_ф в условиях реконструкции как в отсутствие, так и в присутствии рибосомных белков ничего не меняла в картине ее гидролиза. Мы попытались провести предварительную ренатурацию 16S РНК_ф способами, традиционно используемыми для ренатурации рибосомных РНК

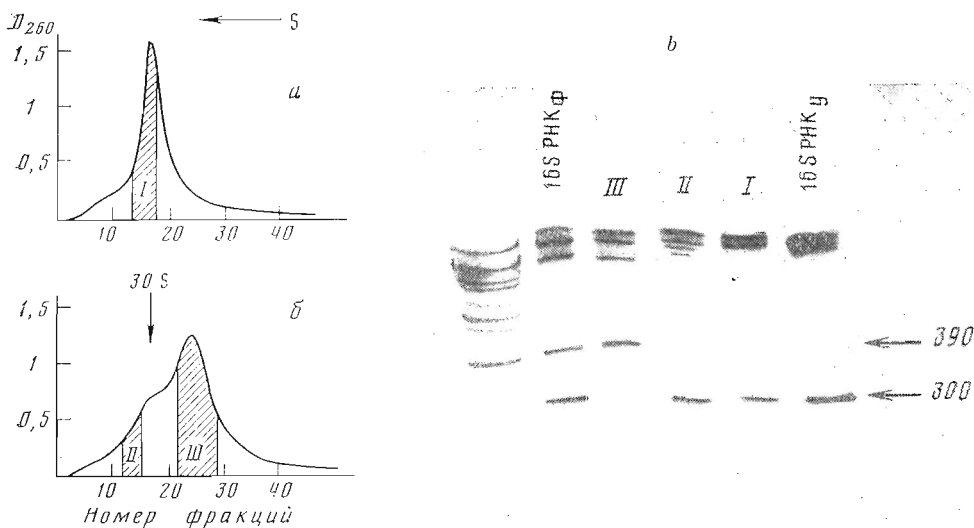


Рис. 4. Реконструкция 30S субчастиц рибосом *in vitro* из 16S РНК_φ (а) и 16S РНК_ψ (б). Центрифугирование в течение 13 ч при 31 тыс. об/мин, градиент сахарозы 10–30% в ТМК-буфере. а – электрофоретическое разделение гидролизатов РНК, выделенной из указанных фракций градиентов, РНКазой Н в присутствии олигонуклеотида (I). В качестве контролей приведены гидролизаты исходных РНК и маркерная колонка

16S РНК_φ предварительно подвергали сильной денатурирующей обработке (интенсивный диализ против буфера, содержащего EDTA, затем против воды или прогрев в течение 5 мин при 60°С в 0,03 М трицин-NaOH, рН 8,0), затем отжигу в стандартном ТМК-буфере при 40°С в течение 1 ч. «Ренатурированная» таким образом РНК продолжала гидролизоваться по типу 16S РНК_φ. По-видимому, для денатурированной 16S РНК существует несколько состояний, каждое из которых характеризуется большей или меньшей легкостью ренатурации. В таком случае состояние 16S РНК_φ нужно рассматривать как крайнюю степень денатурации этой РНК.

С другой стороны, расщепление 16S РНК по типу 16S РНК_ψ еще не означает, что она находится в конформации, полностью компетентной к реконструкции 30S субчастицы.

Действительно, основываясь на работе Баррито с сотр. [21], мы сделали попытку ренатурировать 16S РНК_φ через полное разрушение ее вторичной структуры. Для удаления следов ионов Mg²⁺ образец РНК_φ интенсивно диализовали сначала против буфера 0,01 М трис (рН 7,3), 0,01 М EDTA в течение 12 ч, затем против воды. Подготовленную таким образом 16S РНК прогревали 5 мин при 100°С и резко охлаждали до 0°С. После добавления необходимых солей проводили гидролиз РНКазой Н в присутствии олигонуклеотида (I) при 4°С. 16S РНК гидролизовалась строго по типу 16S РНК_ψ (рис. 5). В системе реконструкции 30S субчастиц *in vitro* она образовывала частицы, седиментирующие в сахарозном градиенте в виде гомогенного пика. По скорости седиментации эти частицы, однако, занимали положение, промежуточное между контрольными 30S субчастицами и РНП-частицами, образующимися в системе реконструкции из 16S РНК_φ.

Какие особенности методов выделения могут обуславливать конформационные различия двух форм 16S РНК? Характерной особенностью метода уксуснокислой экстракции, предложенного Хохкепелем и Крэвенем [14], является то, что выделение идет при высокой концентрации ионов Mg²⁺. Фенольная же депротенинизация проводилась нами в присутствии EDTA в бессолевых условиях. Роль ионов Mg²⁺ в создании и поддержании структурных элементов РНК общезвестна (см., например, [16]). Можно предположить, что в результате фенольной депротенинизации в используе-

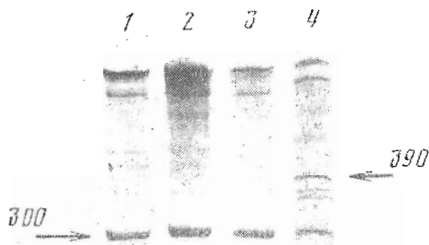


Рис. 5. Электрофоретическое разделение гидролизатов 16S РНК, выделенной из соответствующих пиков сахарозного градиента уксуснокислой экстракцией, РНКазой Н в присутствии олигонуклеотида (I): 1 — 16S РНК_у, 2 — 16S РНК, получена из 30S субчастиц, реконструированных из 16S РНК_у; 3 — 16S РНК, получена из РНП-частиц, образующихся в условиях реконструкции из ренатурированной 16S РНК_ф; 4 — 16S РНК, получена из РНП-частиц, образующихся в условиях реконструкции из 16S РНК_ф.

мых нами условиях происходит сильное общее разрыхление РНК, в результате чего под действием EDTA удаляются структурно необходимые, прочно связанные ионы Mg^{2+} . Следствием этого и является необратимая денатурация РНК. Разрушающийся узел или узлы, по-видимому, существенны для взаимодействия с белками. В результате РНК становится неактивной в системе реконструкции 30S субчастиц. Интересно в связи с этим, что, если фенольная депротеинизация проводилась в растворах высокой ионной силы, необратимой денатурации не происходило, 16S РНК была активна в системе реконструкции и гидролизовалась по типу 16S РНК_у. Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют, что направленный гидролиз РНК с помощью РНКазы Н при условии соответствующего подбора олигодезоксирибонуклеотидов может служить чувствительным тестом на конформационные превращения РНК. Его преимуществами являются узкая направленность и сравнительная легкость локализации мест разрывов. Метод, по-видимому, окажется полезным при исследовании конформационных переходов, связанных с функционированием рибосом.

Экспериментальная часть

Получение исходных препаратов. 16S РНК выделяли из 30S субчастиц рибосом *E. coli* MRE-600 двумя методами. 16S РНК_у выделяли по методике, предложенной Хохкеппелем и др. [14]. Для выделения 16S РНК_ф раствор 30S субчастиц в буфере 0,01 М трис-НСl (рН 7,3), 0,01 М EDTA, содержащем 0,5% додецилсульфата натрия, трижды депротеинизовали равными объемами фенола, насыщенного этим же буфером. РНК осаждали из водной фазы двумя объемами этанола, подкисленного раствором ацетата натрия (рН 5,0), и дважды переосаждали из 0,03 М трицин-NaOH, рН 8,0. Осадок растворяли в 0,03 М трицин-NaOH, рН 8,0, и интенсивно встряхивали с суспензией бентонита в течение 3 мин. Бентонит отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 20 тыс. об/мин на центрифуге JA-21 (Бекман, США). Раствор РНК хранили при $-20^{\circ}C$.

РНКазу Н (КФ 3.1.4.34) выделяли из *E. coli* MRE-600 как описано ранее [4]. Фермент хранили при $-40^{\circ}C$ в растворе, содержащем 40% (по объему) буфера 0,02 М трис-НСl (рН 7,9), 0,1 М NaCl, 0,05 М KCl, 0,1 мМ EDTA, 0,1 мМ дитиотреит и 60% глицерина. Объемная активность фермента составляла 24–28 ед./мл.

Индивидуальные олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы твердофазным методом так, как это было описано ранее [22].

Цитидин-3',5'-[5'- ^{32}P]дифосфат (^{32}P Ср) получали фосфорилированием 3'-СМР с помощью $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ (1000 Ки/моль, Amersham) и Т4-полинуклеотидкиназы (КФ 2.7.1.78) (предоставлена проф. Ч. Кантором, США) [23].

Гидролиз РНКазой Н. Растворы 16S РНК в 0,03 М трицин- NaOH , pH 8,0 (10 мкг на образец) и олигонуклеотида в воде смешивали в необходимом мольном соотношении. Концентрированные растворы солей и дитиотрепта добавляли до получения заданных конечных концентраций. Концентрация РНК в инкубационной смеси составляла 0,1–1 мг/мл. После добавления фермента смесь инкубировали при 4°С нужное время. Реакцию останавливали добавлением NaCl до 0,5 М и трех объемов этанола или фенольной депротенизацией инкубационной смеси.

Анализ продуктов гидролиза производили с помощью электрофореза в денатурирующем 4% ПАГ в условиях, описанных Максамом и Гилбертом [24]. Спиртовой осадок гидролизованной РНК растворяли в смеси для нанесения, представляющей собой раствор красителей-маркеров (бромфеноловый синий и ксиленианол) в 7 М мочевины на 5-кратно разбавленном электродном буфере. Гели окрашивали метиленовым синим.

Разделение продуктов гидролиза и определение мест разрыва. Для выделения 300-членного фрагмента 3 OE₂₆₀ 16S РНК_ф гидролизовали в стандартных солевых условиях в присутствии 0,055 OE₂₆₀ олигонуклеотида d(T-T-C-C-T-T-T-G-A) и 32 мкл фермента в течение 1 ч при 4°С. Гидролиз останавливали добавлением NaCl до 0,5 М и 3 объемов этанола. Выпавший осадок РНК растворяли в смеси для нанесения и наносили на 8% полиакриламидный гель. Зону 300-членного фрагмента, локализованную по УФ-поглощению с помощью флуоресцирующего экрана, вырезали из геля и фрагмент экстрагировали 300 мкл раствора: 0,5 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 0,1 мМ EDTA, 0,1% додецилсульфат Na в присутствии 100 мкл насыщенного водной фенола [25]. Фрагменты из водного слоя осаждали 3 объемами этанола, переосаждали и высушивали. К сухому остатку добавляли 100 мкг/мл ³²рСр и 55 ед. Т4-РНК-лигазы (КФ 6.5.1.3; СКТЬ БАВ, Новосибирск) в 20 мкл буфера 0,1 М трис- HCl (pH 7,9), 0,02 М MgCl_2 , 3 мМ АТР, 20 мМ меркаптоэтанол, 8% диметилсульфоксид, 50 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина и инкубировали 14 ч при 4°С [23]. Фрагменты осаждали спиртом, растворяли в смеси для нанесения и разделяли электрофорезом в 14% ПАГ. Гель подвергали радиоавтографии в течение 1 ч (рентгеновская пленка РМ-1, Тасма). Радиоактивные зоны вырезали из геля, фрагменты РНК элюировали, как было описано раньше, и определяли их первичную структуру по методике, описанной Петти [18], используя 20% ПАГ (20×40 см, толщина 0,5 мм). Радиоавтография на пленке РМ-3 (Тасма) с усиливающим экраном ЭУ-ВЗ У4.2 (отечественного производства) в течение 1–4 недель при –20°С.

Для определения места разрыва, образующего 390-членный фрагмент, по схеме I 10 OE₂₆₀ 16S РНК_ф инкубировали в присутствии 0,43 OE₂₆₀ олигонуклеотида d(C-C-T-G-T-C-T) и 20 мкл РНКазы Н в 0,03 М трицин- NaOH (pH 8,0), 0,02 М $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 0,2 М KCl , 0,1 мМ дитиотрепт в течение 90 мин при 4°С. Гидролиз останавливали с помощью фенольной депротенизации в условиях выделения 16S РНК_ф. Водный слой прогревали 3 мин при 70°С и фрагменты РНК осаждали 3 объемами этанола. Осадок растворяли в 100 мкл буфера 0,01 М трис- HCl (pH 7,9), содержащего 0,1 М KCl , 0,001 М EDTA, и наслаивали на градиент сахарозы (5–20%) в этом же буфере. Центрифугировали 15 ч при 37 тыс. об/мин, ротор SW-41 (Beckman). Чистоту фракций проверяли с помощью электрофореза в 4% ПАГ. Фракции, содержащие индивидуальный 500-членный фрагмент, объединяли и фрагменты осаждали этанолом. Осадок, содержащий около 1 OE₂₆₀ олигонуклеотида, высушивали, растворяли в буфере для инкубации с ферментом и инкубировали с 0,024 OE₂₆₀ олигонуклеотида d(T-T-C-C-T-T-T-G-A) и 15 мкл РНКазы Н в течение 1 ч при 4°С. Гидролиз останавливали фенольной депротенизацией, как было описано выше. Осадок после спиртового осаждения растворяли в 7 мкл смеси для лигирования, содержащей 25 мкг/мл ³²рСр и 14 ед. Т4-РНК-лигазы, и инкубировали 16 ч при 4°С. Дальнейшие операции повторяли соответствующие операции по определению 3'-конца 300-членного фрагмента.

Эксперимент по схеме II проводился аналогично. На первой стадии гидролиза 20 OE₂₆₀ 16S РНК_ф инкубировали в присутствии 0,13 OE₂₆₀ оли-

гонуклеотида d(T-T-C-C-T-T-T-G-A) и 120 мкл РНКазы Н в 0,03 М трицин-NaOH (рН 8,0) и 0,02 М Mg(CH₃COO)₂, 0,4 М KCl, 0,5 мМ дигиотреит в течение 1 ч при 4°С. Из сахарозного градиента выделяли около 2 ОЕ₂₆₀ 1150-членного фрагмента, которые гидролизovali в присутствии 0,1 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотида d(C-C-T-G-T-C-T) и 5 мкл РНКазы Н в течение 1 ч при 4°С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Метелев В. Г., Степанова О. Б., Чичкова Н. В., Родионова Н. П., Смирнов В. Д., Богданова С. Л., Сергеева Н. Ф., Ратманова К. И., Богданов А. А., Шабарова З. А., Атабеков И. Г. Биол. науки, 1978, № 8, с. 27-30.
2. Donis-Keller H. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, N 1, p. 179-192.
3. Meteleev V. G., Rodionova N. P., Chichkova N. V., Atabekov I. G., Bogdanov A. A., Shabarova Z. A., Berzin V., Jansone I., Gren E. J. FEBS Lett., 1980, v. 120, № 1, p. 17-20.
4. Метелев В. Г., Степанова О. Б., Чичкова Н. В., Смирнов В. Д., Родионова Н. П., Берзин В. М., Янсоне Н. В., Грен Е. Я., Богданов А. А., Шабарова З. А., Атабеков И. Г. Молекулярн. биология, 1980, т. 14, № 1, с. 200-211.
5. Скрипкин Е. А., Каграманова В. К., Чичкова Н. В., Копылов А. М., Богданов А. А. Биохимия, 1981, т. 46, № 12, с. 2250-2256.
6. Mankin A. S., Skripkin E. A., Chichkova N. V., Kopylov A. M., Bogdanov A. A. FEBS Lett., 1981, v. 131, № 2, p. 253-256.
7. Sippel A. E., Stavrianopoulos J. G., Schutz G., Feigelson P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, № 11, p. 4635-4639.
8. Spector D. H., Baltimore D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, N 8, p. 2983-2987.
9. Rowlands D. J., Harris T. J. R., Brown F. J. Virol., 1978, v. 26, № 2, p. 335-343.
10. Чумаков К. М., Чичкова Н. В., Азоя В. И. Докл. АН СССР, 1979, т. 246, № 4, с. 994-996.
11. Backendorf C., Overbeck G. P., Van Boom J. H., Van der Marel G., Veenman G., Van Duin J. Eur. J. Biochem., 1980, v. 110, N 2, p. 599-604.
12. Sypherd P. S. J. Mol. Biol., 1971, v. 56, N 2, p. 311-318.
13. Ungewickell E., Garrett R. A., Le Bret M. FEBS Lett., 1977, v. 84, N 1, p. 37-42.
14. Hochkeppel H.-K., Spicer E., Craven G. R. J. Mol. Biol., 1976, v. 101, N 2, p. 155-170.
15. Muto A., Zimmermann R. A. J. Mol. Biol., 1978, v. 121, N 1, p. 1-15.
16. Поранов А. П., Богданов А. А. Молекулярн. биология, 1977, т. 11, № 3, с. 545-554.
17. Vassilenko S. K., Carbon P., Ebel J.-P., Ehresmann C. J. Mol. Biol., 1981, v. 152, N 4, p. 699-721.
18. Peattie D. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, N 4, p. 1760-1764.
19. Noller H. F., Woese C. R. Science, 1981, v. 212, N 4493, p. 403-411.
20. Stiegler P., Carbon P., Zuker M., Ebel J.-P., Ehresmann C. C. R. Acad. Sci. Paris, 1980, v. 291, ser. D, N 12, p. 937-940.
21. Barritault D., Guerin M. F., Hayes D. H. Eur. J. Biochem., 1979, v. 98, N 2, p. 567-571.
22. Potapov V. K., Veiko V. P., Koroleva O. N., Shabarova Z. A. Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, N 6, p. 2041-2056.
23. England T. E., Bruce A. G., Uhlenbeck O. C. In: Methods in Enzymol., v. 65. N. Y.-London: Acad. Press, 1980, p. 65-74.
24. Mazam A. M., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, N 2, p. 560-564.
25. Mazam A. M., Gilbert W. In: Methods in Enzymol., v. 65. N. Y.-London: Acad. Press, 1980, p. 499-560.

Поступила в редакцию 10.III.1982

APPLICATION OF DIRECTED FRAGMENTATION WITH RNase H TO A STUDY OF CONFORMATIONAL CHANGES IN THE RIBOSOMAL 16S RNA

GAIDA G. Z., SPUNDE A. Ya., SKRIPKIN E. A., KAGRAMANOVA V. K., VEIKO V. P., CHICHKOVA N. V., BOGDANOV A. A.
A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Biorganic Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow

16S RNA from the *E. coli* ribosomes was treated with RNase H in the presence of synthetic oligodeoxyribonucleotides. The products of the enzymatic reaction were examined by electrophoresis in 4% polyacrylamide gel. The hydrolysis pattern depended on the method of RNA isolation. 16S RNA prepared by a phenol-SDS-EDTA extraction was split at position 1152-1153 in the presence of oligonucleotide d(T-T-C-C-T-T-T-G-A). It resulted in appearance of the 3'-end fragment of 16S RNA of 390 nucleotide length. After more prolonged hydrolysis, an additional cleavage at position 301-302 take place. 16S RNA prepared by acetic acid precipitation in the presence of urea and high Mg²⁺ concentration was split only at position 301-302. These two conformers of 16S RNA were split in the same position 1047-1048 when digested in the presence of d(C-C-T-G-T-C-T) oligonucleotide. The positions of the cuts were determined by sequencing 3'-ends of the fragments. Reciprocal transformation of the two 16S RNA conformers and their behaviour in the process of in vitro reconstitution of 30S ribosomal subunits were studied. The data obtained allow to conclude that the appearance of the 390 nucleotide fragment is indicative of considerable conformational changes in the 3'-terminal region due to profound denaturation.