



УДК 547.963.32.02 : 577.113.5 : 577.152.314

СРАВНЕНИЕ ДВУХ ФОРМ 16S РНК *E. coli* С ПОМОЩЬЮ
ГИДРОЛИЗА РНКАЗОЙ Н В ПРИСУТСТВИИ СИНТЕТИЧЕСКИХ
ГЕКСАДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ
СО СЛУЧАЙНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ ОСНОВАНИЙ *

Гайда Г.З., Колосов М.И., Чичкова Н.В.,
Богданов А.А.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Препараты рибосомной 16S РНК *E. coli*, полученные двумя различными методами, подвергались гидролизу РНКазой Н в присутствии смеси синтетических гексадезоксирибонуклеотидов со случайной последовательностью оснований. Места разрывов картировали в нуклеотидной последовательности 16S РНК с помощью секвенирования 3'-концевых участков образующихся фрагментов. Показано, что все проанализированные фрагменты возникают за счет разрыва полинуклеотидной цепи 16S РНК лишь в пяти местах. Два из них (после нуклеотидных остатков G⁷²⁴ и A¹³⁹⁴) обнаружены только в препаратах 16S РНК, выделенных методом фенольно-детергентной экстракции в присутствии EDTA, два (после нуклеотидных остатков A³²⁹ и A¹³³¹) — в препаратах 16S РНК, полученных в результате экстракции белков уксусной кислотой в присутствии высоких концентраций ионов Mg²⁺ и мочевины, и одно (после нуклеотидных остатков C⁴⁷⁵—U⁴⁷⁶) — общее для обоих препаратов.

В настоящее время принято считать, что конформация РНК в растворе определяется системой вторичных и третичных взаимодействий и в конечном счете ее нуклеотидной последовательностью. Однако достаточно большие молекулы, такие, как, например, 16S рРНК *E. coli*, способны существовать в виде нескольких метастабильных конформеров в зависимости от метода выделения и предыстории образцов [2—5]. В предыдущей работе мы показали, что гидролиз РНК РНКазой Н в присутствии уникальных синтетических олигодезоксирибонуклеотидов может служить тестом на ее конформационное состояние [6]. Сравнивая препараты 16S РНК *E. coli*, выделенные двумя разными методами — фенольной экстракцией в присутствии EDTA из растворов с низкой ионной силой (16S РНК_ф) и осаждением 75% уксусной кислотой в присутствии высоких концентраций ионов Mg²⁺ и мочевины (16S РНК_у), мы показали, что они по-разному гидролизуются в присутствии олигодезоксирибонуклеотида d(T-T-C-C-T-T-T-G-A). В случае 16S РНК_ф гидролиз начинался с образования разрыва после A¹¹⁵². При более глубоком гидролизе происходил также разрыв после C³⁰¹. В случае 16S РНК_у разрыв по положению 1152 никогда не наблюдался, хотя по положению 301 она гидролизовалась так же, как 16S РНК_ф. В то же время в присутствии олигодезоксирибонуклеотида d(C-C-T-G-T-C-T) обе формы 16S РНК гидролизовались одинаково с образованием разрыва после G¹⁰⁴⁷. Мы предположили, что особенности гидролиза отражают конформационные различия двух препаратов 16S РНК, связанные с денатурацией ее 3'-концевого района.

С целью более детального изучения этих различий, а также имея в виду дальнейшее накопление данных об участках 16S РНК, доступных для гидролиза РНКазой Н, мы исследовали расщепление двух форм 16S РНК этим ферментом в присутствии смеси синтетических гексадезоксирибонуклеотидов со случайной последовательностью оснований. Теоретически можно ожидать, что в такой смеси (с набором последовательностей, близким к статистическому) для любого одноотяжевого участка РНК найдется комплементарный гексадезоксирибонуклеотид, распределение же мест раз-

* Предварительное сообщение см. [1].

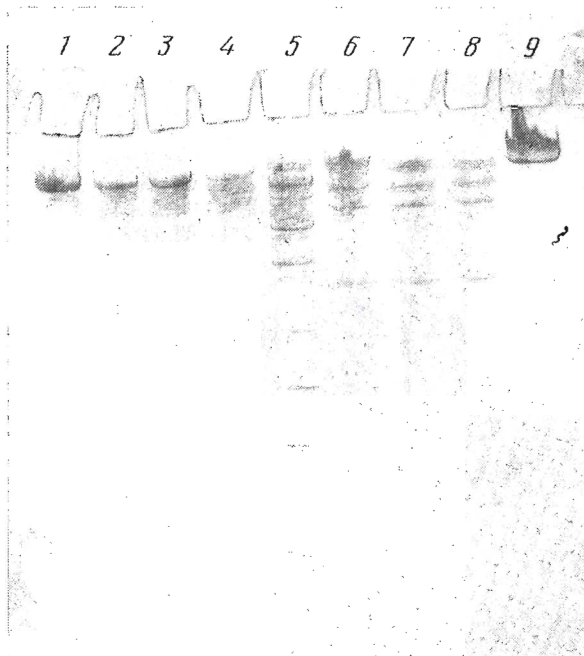


Рис. 1. Электрофоретическое (4% полиакриламидный гель) разделение гидролизатов 16S РНК РНКазой Н в присутствии гексадезоксирибонуклеотидов. Каждый образец, содержащий 29 мкг 16S РНК, инкубировали с 1 мкг фермента при мольном соотношении олигонуклеотид — РНК 3 : 1 указанное время. Контрольные образцы инкубировали без олигонуклеотидов. 16S РНК_γ: 1 — контроль, 2—4 — инкубация 60, 90 и 120 мин соответственно; 16S РНК_φ: 6—8 — инкубация 60, 90 и 120 мин соответственно, 9 — контроль; 5 — маркерная колонка

рывов будет определяться конформационным состоянием РНК в момент гидролиза РНКазой Н. При определении мест разрывов следует иметь в виду, что продукты гидролиза РНКазой Н имеют фосфатную группу на 5'-конце и свободный 3'-гидроксил. По этому признаку они отличаются от фрагментов, образующихся в той или иной степени в реакционной смеси под действием большинства посторонних примесных РНКаз. После введения ³²P-метки в 3'-концы фрагментов с помощью ³²pСр и Т4-РНК-лигазы определяли их коцевую последовательность и места разрывов картировали в известной структуре 16S РНК.

Подбор условий гидролиза производили с помощью электрофоретического разделения гидролизатов в 4% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Гели окрашивали метиленовым синим. Как видно из рис. 1, в довольно широком интервале условий устойчиво воспроизводится картина распределения высокомолекулярных фрагментов, характерная для каждой формы РНК. Электрофоретическое разделение этой же смеси после введения концевой метки также дало хорошо воспроизводимую картину распределения фрагментов, однако радиоактивный материал оказался сосредоточен в области низкомолекулярных фрагментов (не более 100—200 нуклеотидов). Последующее окрашивание радиоактивных гелей метиленовым синим показало, что этот эффект не связан с деградацией РНК в процессе мечения. По-видимому, более интенсивное включение метки в низкомолекулярные фрагменты обусловлено специфичностью РНК-лигазы. Мы остановились на условиях, обеспечивающих сравнительно невысокую степень гидролиза, когда значительная часть РНК еще остается интактной. В препаративных экспериментах гидролиз проводили в условиях 2 и 6 (рис. 1), а также при несколько большем соотношении олигонуклеотид : РНК. После введения концевой метки фрагменты разделяли с помощью электрофореза (рис. 2).

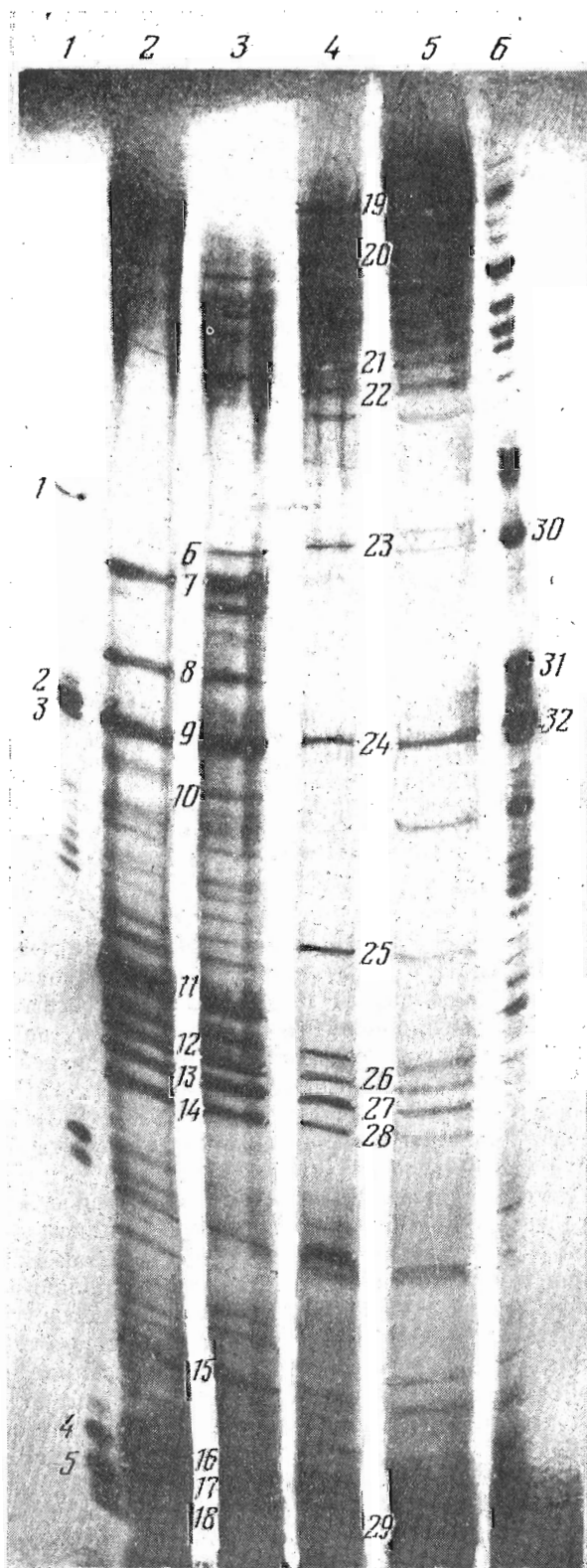
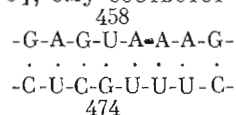


Рис. 2. Радиоавтограф электрофоретического разделения фрагментов в 14% полиакриламидном геле. 1-3 - 16S РНК_φ; 4-6 - 16S РНК_ψ. 1-6 - контроли; 2 и 5 - олигонуклеотид - РНК, 3:1; 3 и 4 - олигонуклеотид - РНК, 7,5:1. Цифрами отмечены секвенированные фрагменты

Фрагменты 16S РНК, идентифицированные секвенированием

Положение 3'-концевого нуклеотида в последовательности 16S РНК	Фрагменты 16S РНК _ф	Фрагменты 16S РНК _у	Фрагменты контрольных 16S РНК
329		19, 20	
475-476	12, 13, 14, 15	26, 27, 28	5
724	7, 8, 9, 11		
1394	10		
1531		25	
1542 (3'-конец 16S РНК)	6, 16, 17, 18	21, 22, 23, 24, 29	1, 2, 3, 4, 30, 31, 32

Как и в случае высокомолекулярных фрагментов, общая картина электрофоретического разделения мало зависела от глубины гидролиза. Оба препарата 16S РНК дали качественно похожие спектры фрагментов. Однако они заметно различались интенсивностью отдельных полос. В случае 16S РНК_ф выделяются полосы 7-11, в случае 16S РНК_у — полосы 19, 20 и 25 (рис. 2). Все фрагменты, содержавшие радиоактивную метку в количествах, достаточных для последующего секвенирования, элюировали из геля. Их нуклеотидная последовательность определялась методом химического секвенирования, предложенным Петти [7]. Первичная структура коротких фрагментов (до 50 нуклеотидов) установлена полностью. Для более длинных фрагментов прочитана 3'-концевая часть, соответствующая месту разрыва. Поскольку 5'-концы фрагментов могли образоваться и под действием неспецифических РНКаз, мы не принимали их к рассмотрению. Из 39 элюированных фрагментов 32 удалось однозначно локализовать в первичной структуре 16S РНК. 16 из них образуются из 3'-концевой части 16S РНК, что соответствует представлениям о ее высокой доступности. 3'-Концы остальных фрагментов соответствуют пяти местам разрыва (таблица). Два из них обнаружены только в препарате 16S РНК_ф (соответствующие 3'-концевые нуклеотиды: G⁷²⁴ и A¹³⁹⁴), два — только в препарате 16S РНК_у (A³²⁹ и A¹⁵³¹) и одно — в обоих препаратах (C⁴⁷⁵ — U⁴⁷⁶). Судя по интенсивности гидролиза, последнее место разрыва, очевидно, соответствует исключительно доступному и реакционноспособному участку 16S РНК. Согласно существующим моделям [8, 9], ему соответствует



существование которой подтверждено данными сравнительного филогенетического анализа и образованием ковалентной сшивки между U⁴⁷³ и U⁴⁵⁸ с помощью псоралена [10]. Вторичная структура здесь должна быть несколько ослаблена, так как G⁴⁷⁴ образует дефектную G·U-пару. Возникновение разрыва в этом месте, видимо, обусловлено нестабильностью вторичной структуры РНК по крайней мере в основании шпильки. Об этом также свидетельствуют данные по химической модификации G⁴⁷⁴, C⁴⁷⁵ и U⁴⁷⁶ в составе 30S субчастиц [11].

Свидетельство большой экспонированности данного района 16S РНК, полученное в нашей работе, по-видимому, не случайно. Ряд фактов указывает на то, что эта экспонированность сохраняется в составе целой субчастицы и, возможно, имеет функциональное значение. Кроме доступности модифицирующим агентам, район 475-го нуклеотидного остатка подвержен гидролизу иммобилизованной панкреатической РНКазой, причем это место является одним из основных мест гидролиза [12]. Особенно интересно, что при использовании фотоактивируемого аналога мРНК его удалось ковалентно сшить с G⁴⁶² и G⁴⁷⁴ [12].

Остальные места разрывов соответствуют участкам, не вовлеченным в образование шпильчатых структур. Практически все фрагменты контрольных образцов, инкубировавшихся с ферментом в отсутствие олигонуклеотидов, оказались производными 3'-конца молекулы. Остается непонятным

появление фрагмента 5 в контроле 16S РНК_ф, который включает в себя последовательность нуклеотидов с 455-го по 475-й.

Результаты нашей работы, конечно, дают представление о конформационном состоянии лишь отдельных районов 16S РНК. Во-первых, они ограничены тем, что в настоящей работе анализировалась нуклеотидная последовательность лишь сравнительно небольших фрагментов. Во-вторых, выбранные нами мягкие условия гидролиза позволяли выявить только наиболее экспонированные участки в молекуле РНК. Возможно, этим объясняется то, что среди локализованных нами мест разрыва мы не обнаружили тех, которые получали ранее в присутствии уникальных олигодезоксирибонуклеотидов. Несмотря на ограничения, приведенные результаты подтверждают существенные конформационные различия двух форм 16S РНК. Эти различия не сосредоточены в одном домене, а, по-видимому, затрагивают всю макромолекулу 16S РНК.

Результаты настоящей работы будут использованы в дальнейшем при получении РНК с одиночными разрывами в заданных участках ее полинуклеотидной цепи.

Экспериментальная часть

Получение исходных препаратов. 16S РНК выделяли из 30S субчастиц *E. coli* MRE 600: 16S РНК_у — по методике, предложенной Хохкепелем с сотр. [14], 16S РНК_ф — как было описано ранее [6]. Растворы РНК (3–4 мг/мл) в 0,03 М трицин-NaOH, pH 8,0, хранили при -20°С.

РНКазу H (КФ 3.1.26.4) выделяли из *E. coli* MRE 600 как описано ранее [14]. Объемная активность фермента 21–28 ед./мл.

Смесь гексадезоксирибонуклеотидов со случайным чередованием номерных звеньев была синтезирована твердофазным методом [15] и любезно предоставлена В. П. Вейко (кафедра химии природных соединений химического факультета МГУ). Нуклеотидный состав смеси гексадезоксирибонуклеотидов (%): А 36,0, С 27,4, G 14,9 и T 21,7.

Цитидин-3',5' [5'-³²P] дифосфат (³²pCp) получали фосфорилированием 3'-СМР с помощью [γ-³²P]АТР (3000 Ки/моль, СССР) и Т4-полинуклеотид-5'-гидроксилкиназы (КФ 2.7.1.78) (предоставлена профессором Ч. Кантором, США) [16].

Гидролиз РНКазой H. Образцы 16S РНК (160 мкг в опыт и 40 мкг в контроль) инкубировали с 16 и 4 мкл фермента соответственно в растворе, содержащем 0,03 М трицин-NaOH (pH 8,0), 0,01 М MgCl₂, 0,2 М KCl, 0,1 мМ дитиотреит, в течение 60 мин при 4°С. В отличие от контроля в опыт добавляли гексадезоксирибонуклеотиды в мольном соотношении олигонуклеотид — 16S РНК, равном 3:1 и 7,5:1. Гидролиз останавливали депротенизацией водонасыщенным фенолом. Фрагменты осаждали тремя объемами холодного этанола, промывали этанолом и высушивали.

Определение нуклеотидной последовательности фрагментов. 3'-Концевую ³²P-метку вводили как описано ранее [6]. Каждый осадок фрагментов РНК растворяли в 4 частях (опыт) или 1 части (контроль) смеси для лигирования, содержащей 1 мКи ³²pCp и 300 ед. Т4-РНК-лигазы (КФ 6.5.1.1; СКТВ БАВ, Новосибирск), и инкубировали 15 ч при 4°С. Фрагменты осаждали спиртом, растворяли в 100-кратно разбавленном электродном буфере, содержащем 8 М мочевины и красители-маркеры, и наносили на 14% полиакриламидный гель (20×40×0,1 см) с соотношением акриламид-бисакриламид, равным 25:1. Электрофорез проводили в трис-боратной системе, pH 8,3 [17]. Гели радиоавтографировали с помощью рентгеновской пленки РМ-1 (Тасма). Радиоактивные зоны элюировали из геля как описано в работе [6] и определяли первичную структуру фрагментов химическим секвенированием по методике, предложенной Петти [7], используя 20% полиакриламидный гель толщиной 0,5 мм. Радиоавтография на пленке РМ-В (Тасма) с усиливающим экраном ЭУ-ВЗ У4.2 (отечественного производства) в течение 1–4 недель при -20°С.

Авторы выражают благодарность В. П. Вейко за любезно предоставленный препарат гексадезоксирибонуклеотидов, А. Л. Иштутиной за помощь в выделении субчастиц рибосом, В. К. Каграмановой и А. С. Манькину за помощь при определении первичной структуры фрагментов РНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гайда Г. З., Чичкова Н. В., Богданов А. А. Тез. докл. VI двустороннего симпозиума СССР – Франция. Цхалтубо, 1982, с. 102.
2. Sypherd P. S. J. Mol. Biol., 1971, v. 56, № 2, p. 311–318.
3. Ungewickell E., Garrett R. A., Le Bret M. FEBS Lett., 1977, v. 84, № 1, p. 37–42.
4. Hochkeppel H.-K., Spicer E., Craven G. R. J. Mol. Biol., 1976, v. 101, № 2, p. 155–170.
5. Muto A., Zimmermann R. A. J. Mol. Biol., 1978, v. 121, № 1, p. 1–15.
6. Гайда Г. З., Спундэ А. Я., Скрипкин Е. А., Каграманова В. К., Вейко В. П., Чичкова Н. В., Богданов А. А. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 8, с. 1052–1062.
7. Peattie D. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 4, p. 1760–1764.
8. Noller H. F., Woese C. R. Science, 1981, v. 212, № 4493, p. 403–411.
9. Stiegler P., Carbon P., Zuker M., Ebel J.-P., Ehresmann C. C. R. Acad. Sci. Paris, 1980, v. 291, ser. D, № 12, p. 937–940.
10. Turner S., Thompson J. F., Hearst J. E., Noller H. F. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 9, p. 2839–2849.
11. Woese C. R., Magrum L. J., Gupta R., Siegel R. B., Stahl D. A., Kop J., Crawford N., Brosius J., Guttell R., Hogan J. J., Noller H. F. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 10, p. 2275–2293.
12. Spitnik-Elson P., Elson D., Avital S., Abramowitz R. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 6, p. 1995–2006.
13. Wagner R., Gassen H. G., Ehresmann C., Stiegler P., Ebel J.-P. FEBS Lett., 1976, v. 67, № 3, p. 312–315.
14. Метелев В. Г., Степанова О. Б., Чичкова Н. В., Смирнов В. Д., Родионова Н. П., Берзинь В. М., Янсонс Н. В., Грен Е. Я., Богданов А. А., Шабарова З. А., Атабеков И. Г. Молекулярн. биология, 1980, т. 14, № 1, с. 200–211.
15. Potapov V. K., Veiko V. P., Koroleva O. N., Shabarova Z. A. Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 6, p. 2041–2056.
16. England T. E., Bruce A. G., Uhlenbeck O. C. In: Methods in Enzymol./Eds Grossman L., Moldave K. N. Y. – London: Acad. Press, 1980, v. 65, p. 65–74.
17. Maxam A. M., Gilbert W. In: Methods in Enzymol./Eds Grossman L., Moldave K. N. Y. – London: Acad. Press, 1980, v. 65, p. 499–560.

Поступила в редакцию
2.XI.1982

A COMPARISON OF TWO FORMS OF *E. COLI* 16S RNA BY HYDROLYSIS WITH RNase H IN THE PRESENCE OF SYNTHETIC HEXADEXOXYRIBONUCLEOTIDES WITH RANDOM BASE SEQUENCES

GAIDA G. Z., KOLOSOV M. I., CHICHKOVA N. V., BOGDANOV A. A.

A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow

16S RNA from the *E. coli* ribosomes was prepared by two different methods: phenol – SDS – EDTA extraction (designated as 16S RNA-Ph) and acetic acid extraction in the presence of urea and high Mg²⁺ concentration (16S RNA-Ac). The two samples were treated with RNase H in the presence of synthetic hexaideoxyribonucleotides with random base sequences. The positions of the cuts in the 16S RNA chain were determined by sequencing the 3'-ends of the fragments. All the analyzed fragments corresponded to five cleavage sites. Two of them (after G⁷²⁴ and A¹³⁹⁴) were found only in the samples of 16S RNA-Ph, another two (after A³²⁹ and A¹⁵³¹) – only in the samples of 16S RNA-Ac and one cleavage site (after C⁴⁷⁵–U⁴⁷⁶) in both samples.