



УДК 577.113.083

ОБЩИЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА СШИТЫХ
С БЕЛКОМ ФРАГМЕНТОВ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

Абдурашидова Г. Г., Цветкова Е. А., Будовский Э. П.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

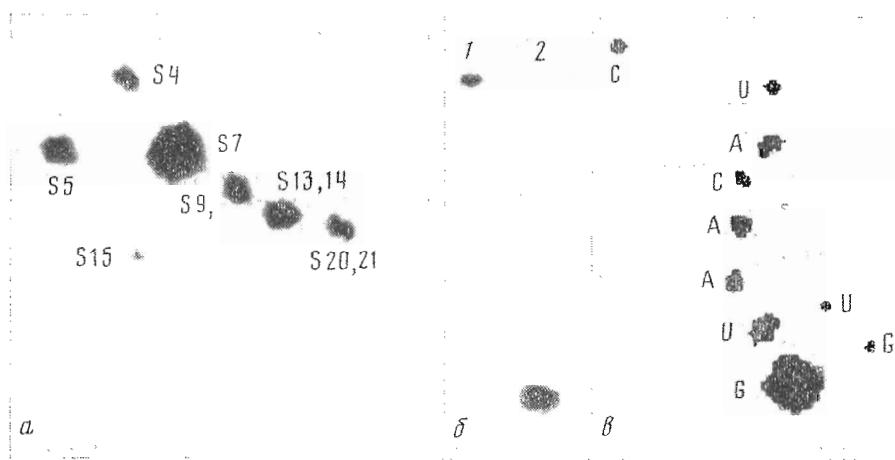
Предложен общий метод выделения и определения первичной структуры фрагментов полинуклеотидов, сшитых с определенным белком в составе многокомпонентных нуклеопротеидов. Метод может быть использован для исходно немеченых комплексов и вне зависимости от способа образования сшивки.

С помощью этого метода выделен фрагмент 16S РНК, ковалентно сшитый с белком S7 при действии ультрафиолетового излучения (254 нм) на 30S субчастицу рибосом *E. coli*. Определена первичная структура этого фрагмента (CUACAAUG) и установлено, что белок S7 ковалентно связывается (сшивается) при облучении свободной 30S субчастицы с U¹²³⁹ 16S РНК, что согласуется с полученными ранее данными.

Для обнаружения непосредственных взаимодействий (контактов) между полинуклеотидами и белками в составе нуклеопротеидов широко используют действие УФ-излучения. При этом образуются ковалентные связи (сшивки) между теми компонентами макромолекул, которые контактировали друг с другом в исходных комплексах [1, 2]. Это позволяет не только идентифицировать белки, взаимодействующие с определенными полинуклеотидами, но и выяснить структуру взаимодействующих фрагментов этих макромолекул, что является одним из наиболее простых подходов к изучению специфических полинуклеотид-белковых взаимодействий. Основное препятствие, сдерживающее развитие этого направления, — отсутствие общего метода выделения сшитых фрагментов полинуклеотидов и белков. Опубликованные ранее работы (см., например, [1, 3, 4]) выполнены с помощью методов, имеющих частное значение, и требуют наличия радиоактивной метки в одной из макромолекул исходного комплекса.

В настоящей работе описаны выделение и анализ фрагмента 16S РНК, сшитого с S7 при УФ-облучении 30S субчастиц рибосом *E. coli*. Разработанный метод имеет общее значение и может быть использован для выделения и анализа фрагментов полинуклеотидов, ковалентно сшитых с белком, вне зависимости от способа образования сшивки и для комплексов, не содержащих исходно меченых макромолекул.

Действие УФ-излучения на свободные 30S субчастицы рибосом *E. coli* приводит к образованию сшивок между 16S РНК и рядом белков, среди которых преобладает белок S7 (рисунок, а, ср. [5]). Для выделения олигонуклеотидного фрагмента, сшитого с белком S7, была использована следующая процедура. После депротенизации облученных субчастиц и действия РНКазы T₁ образуется сложная смесь свободных олигонуклеотидов и олигонуклеотидных фрагментов, сшитых с белками. При действии на гидролизат полинуклеотидкиназы в присутствии [γ -³²P]АТФ идет эффективное фосфорилирование как свободных, так и связанных с белком олигонуклеотидов. В условиях электрофоретического разделения рибосомных белков [6] свободные олигонуклеотидные фрагменты уходят в верхний (анодный) буфер, а миграция в геле пришитых олигонуклеотидов обусловлена преимущественно пришитыми белками. Поэтому распределение радиоактивности в геле после электрофореза отражает положение белков, содержащих ковалентно связанные меченые олигонуклеотиды. Наличие пришитых олигонуклеотидов приводит к небольшому, но характерному



Распределение радиоактивности в ПААГ (*a* и *б*) и на пластинке с полиэтиленими-целлюлозой (*в*). Фото с экрана телемонитора многопроволочной лавинной камеры. *a* — двумерное электрофоретическое разделение белков, пришитых к 16S РНК при УФ-облучении 30S субчастиц рибосом *E. coli*. Радиоактивность обусловлена ^{32}P -мечеными олигонуклеотидами, сшитыми с белками; *б* — электрофоретическое разделение белка S7, содержащего пришитый ^{32}P -олигонуклеотид, до (1) и после (2) действия протеиназы К; *в* — нуклеотидная карта фрагмента 16S РНК, сшитого с белком S7

изменению электрофоретической подвижности белков, что не препятствует их идентификации по положению в полиакриламидном геле после двумерного электрофореза [7]. В связи с этим разделение и идентификация белков, содержащих пришитые олигонуклеотидные фрагменты, дает возможность выделять фрагменты, пришитые к определенным белкам.

При введении метки в олигонуклеотиды кроме белков S4, S7 и S9/11, наблюдающихся после электрофореза при иодировании пришитых белков [8], ^{32}P -радиоактивность от пришитых к белкам олигонуклеотидов наблюдается и в участках геля, соответствующих положению белков S5, S15, S13/14 и S20/21 (рисунок, *a*). В обоих случаях наибольшая радиоактивность сосредоточена в зоне белка S7.

Таким образом, использованный подход не только позволяет выделять фрагменты, ковалентно связанные с определенными белками, но и упрощает процедуру, повышает чувствительность, достоверность и точность идентификации белков, пришитых к олигонуклеотидам в составе нуклеопротеидов.

Нуклеотидная карта олигонуклеотидного фрагмента, сшитого с белком S7 (рисунок, *в*), дает возможность восстановить его первичную структуру и определить место пришивки белка. Более того, частичное расщепление сшивки (вероятно, в условиях неполного статистического гидролиза межнуклеотидных связей) позволяет восстановить полную структуру фрагмента, образующегося при гуанилрибонуклеазном гидролизе 16S РНК — CUACLAUG. Этот фрагмент занимает в 16S РНК положение 1233—1240, причем белок пришивается по U¹²³⁹.

Полученные данные полностью совпадают с результатами, полученными ранее с помощью более сложного и неуниверсального метода [3].

Очевидно, что предложенный в настоящей работе подход имеет ряд ограничений: лабильность сшивки, малая длина фрагмента или близость сшивки к его 5'-концу. Однако они не имеют принципиального характера и легко могут быть устранены использованием мягких условий гидролиза фрагмента, других эндонуклеаз, введем метки по 3'-концу фрагмента и т. д.

Экспериментальная часть

30S субчастицы рибосом *E. coli* MRE-600 любезно предоставлены В. И. Махно (ЛИЯФ, Гатчина). По данным электрофореза, субчастицы содержали деградированную 16S РНК и полный набор белков. Актив-

ность в связывании AcPhe-тРНК^{Phe} в присутствии poly(U) [9] не менее 90%. 30S субчастицы облучали при 254 нм в буфере А (10 мМ MgCl₂, 20 мМ трис-НСl (рН 7,2), 200 мМ NH₄Cl, 6 мМ β-меркаптоэтанол) в стандартных условиях дозами 30 квантов на нуклеотид [7]. Облученные субчастицы депротезировали, РНК осаждали двумя объемами этанола, растворяли в буфере (20 мМ EDTA, 20 мМ трис-НСl, рН 7,2) и гидролизовали рибонуклеазой T₁ (PL Biochemical, США) из расчета 10 ед. акт. T₁ на 1 OE₂₆₀ 30S. T₁-гидролизат подвергали 5'-концевому мечению, используя T₄-полинуклеотидкиназу (НПО «Фермент», Вильнюс) и [γ-³²P]АТР (Amersham, Англия, удельная активность >3000 Ки/ммоль) по методике работы [10].

После этого реакционную смесь подвергали двумерному электрофорезу в ПААГ в системе Меца и Богорада [6]. Идентификацию белков с пришитыми олигонуклеотидами проводили как описано ранее [7] (рисунок, а). Здесь и далее локализацию радиоактивности в геле и на пластинках полиэтиленмицеллолозы проводили с помощью многоступенчатой лавинной камеры [11]. Участок геля, содержащий белок S7 с пришитым ³²P-меченым фрагментом 16S РНК, вырезали, белок гидролизовали протеиназой К (Serva, ФРГ) непосредственно в геле в буфере А (37°С, ~12 ч), концентрация фермента 30 мг/мл. Элюированные из геля фрагменты 16S РНК проверяли на гомогенность в 20% ПААГ в денатурирующих условиях (рисунок, б). Затем вырезали участки геля, содержащие олигонуклеотид; элюцию и гидролиз в 1 М триэтиламине (1,5–2,0 ч, 55°С) проводили одновременно. После упаривания триэтиламина остаток растворяли в 5 мкл H₂O. Нуклеотидные карты получали по методике [12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Schimmel P. R., Budzik G. P. In: Methods in Enzymol./Eds Jacoby W. B., Wilchek M. N. Y.: Acad. Press, 1982, v. 46, p. 168–180.
2. Budowsky E. I. In: Trends in Photobiology/Eds Helene C., Charlier M., Montenay-Garestier Th., Laustriat G. N. Y.–L.: Plenum Press, 1982, p. 93–108.
3. Zwieb C., Brimacombe R. Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 5, p. 1775–1790.
4. Chiaruttini C., Expert-Bezancon A., Hayes D., Ehresmann B. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 3, p. 7657–7676.
5. Zwieb C., Brimacombe R. Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, № 4, p. 1189–1206.
6. Metz L. V., Bogorad L. Anal. Biochem., 1974, v. 57, № 1, p. 200–210.
7. Abdurashidova G. G., Turchinsky M. F., Budowsky E. I. FEBS Lett., 1981, v. 129, № 1, p. 59–61.
8. Абдурашидова Г. Г., Наргизян М. Г., Руденко Н. В., Турчинский М. Ф., Будовский Э. И. Молекулярн. биология, 1985, т. 19, № 4, с. 553–558.
9. Кириллов С. В., Мазно В. Я., Пешин Н. Н., Семенов Ю. П. Молекулярн. биология, 1978, т. 12, № 3, с. 602–611.
10. Donis-Keller H., Mazan M., Gilbert W. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 8, p. 2527–2538.
11. Заневский Ю. В., Иванов А. Б., Каминир Л. Б., Крейншлин Э. Я., Мовчан С. А., Пешехонов В. Д., Чан Дык Тхань, Черненко С. П., Черный А. А. Препринт ОИЯИ, 1983, № 18-83-5, Дубна.
12. Silberklang M., Prockiantz A., Haenni A. Z., Rajbhandary U. Z. Eur. J. Biochem., 1977, v. 72, № 3, p. 465–478.

Поступила в редакцию
24.IV.1985

A GENERAL METHOD FOR ISOLATING AND SEQUENCING POLYNUCLEOTIDE FRAGMENTS CROSS-LINKED TO PROTEINS

ABDURASHIDOVA G. G., TSVETKOVA E. A., BUDOWSKY E. I.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A fragment of 16S RNA, cross-linked to S7 protein by UV irradiation of the 30S subunit of *E. coli* ribosome, was obtained by the action of T₁ ribonuclease on the irradiated nucleoprotein. The digest was treated with polynucleotide kinase in the presence of [γ-³²P]АТР and the S7-cross-linked oligonucleotides were isolated. An individual oligonucleotide attached to S7 protein was obtained after proteinase treatment of the respective spot followed by electrophoresis. Sequencing of this oligonucleotide established its structure as 1233–1240 fragment of 16S RNA, the U¹²³⁹ residue being the site of the S7 cross-linking. The developed general approach can be used for localizing protein – cross-linked residues in polynucleotides, whatever is the procedure employed for cross-linking.