



УДК 578.81.112/113.088.6 : 546.11*3

ВВЕДЕНИЕ ТРИТИЕВОЙ МЕТКИ В РНК И БЕЛОК
БАКТЕРИОФАГА MS2Нейман Л. А., Антропова Л. П., Залеская М. А.,
Будовский Э. И.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Метод термической активации газообразного трития использован для введения радиоактивной метки в нуклеопротеид — бактериофаг MS2. Полученный ^3H фаг с удельной радиоактивностью 20—50 Ки/ммоль в значительной мере сохраняет свою инфекционность и пригоден для использования в различных исследованиях. Включение радиоактивности не только в белковую оболочку, но и во внутрифаговую РНК (в соотношении $\sim 3 : 1$) свидетельствует о том, что белковый капсид не является сплошным.

Прогресс в изучении структуры и свойств вирусов в значительной мере обусловлен возможностью введения в вирион радиоактивной метки. Получение вирусов, содержащих радиоактивные компоненты, во многих случаях предпочтительнее проводить не *in vivo* (размножение вирусов в присутствии радиоактивных предшественников), а *in vitro* — введением метки в компоненты зрелого вириона. Однако модификация структуры этих компонентов с помощью каких-либо радиоактивных групп может вызвать изменение свойств как отдельных компонентов, так и вируса в целом. Меньше всего изменений вызывает изотопный обмен — замещение атомов водорода на атомы трития в молекулах компонентов вириона. Наиболее перспективным из обменных методов нам представляется метод термической активации (МТА) газообразного трития, который уже использовался для введения метки как в низкомолекулярные органические соединения, так и в биополимеры (см. обзор [1]). В частности, с помощью МТА были получены меченные ^3H тРНК [2] и рибосомные РНК [3] и показаны преимущества МТА перед введением трития в полинуклеотиды нагреванием их с ^3HOH высокой удельной радиоактивности [4, 5]. Отметим, что последний способ из-за жесткости условий (90°C , 0,5 ч) для получения меченых нуклеопротеидов вообще неприменим.

В настоящей работе для непосредственного введения ^3H в компоненты бактериофага MS2 использовался МТА (предварительное сообщение см. [6]) с нанесением исходного вещества на бумажную подложку — способ, позволяющий получать меченое соединение с высоким выходом и высокой удельной радиоактивностью (ср. [7, 8]). Бактериофаг MS2 является мелким РНК-содержащим фагом, размножающимся на *E. coli*; он представляет собой сферический нуклеопротеид, состоящий из одной молекулы однонитевой РНК ($M_r 1,1 \cdot 10^6$), 180 молекул белка оболочки ($M_r 1,4 \cdot 10^4$) и одной молекулы так называемого белка созревания ($M_r 3,9 \cdot 10^4$) [9].

Активированные атомы трития генерировали в стандартных условиях МТА [1], которые обеспечивают свободный пробег атомов до мишени (в нашем случае фаг MS2, нанесенный на бумажную подложку). Меченый препарат смывали с бумажной подложки водой и лабильный тритий вместе с низкомолекулярными радиоактивными примесями удаляли гель-фильтрацией. При хроматографии полученного препарата на DEAE-целлюлозе практически все оптическое поглощение обнаруживается в элюате вместе с радиоактивностью в одном пике (при концентрации NaCl 0,3 М), который на хроматографическом профиле совпадает с пиком исходного фага.

Сокращения: МТА — метод термической активации.

**Получение меченого фага MS2 методом термической активации
газообразного трития**

Характеристика	Опыт	Контроль
Количество исходного фага MS2, мг (ОЕ ₂₈₀)	2,5 (20)	2,5 (20)
Инфекционность исходного фага, б. о. е. *	10 ¹¹	10 ¹¹
Количество трития, ГБк (мКи)	1,11 (30)	—
Количество фага после смыва с бумажной подложки, мг (ОЕ ₂₈₀)	0,625 (5)	0,625 (5)
Выход, %	25	25
Инфекционность фага после смыва с бумаги, б. о. е.	5·10 ⁸	5·10 ⁸
Общая радиоактивность, имп./мин	3,3·10 ⁶	—
Удельная радиоактивность, Ки/ммоль	19,4	—

* б. о. е.— бляшкообразующие единицы.

В этих условиях свободная фаговая РНК не десорбируется. Следовательно, ни при введении тритиевой метки, ни при выделении меченого препарата вирион не разрушается.

Из приведенных в таблице результатов видно, что выход меченого фага составляет ~25%, а его инфекционность падает в 250 раз. Чтобы проверить, связаны ли эти потери с действием трития, был проведен контрольный эксперимент: водную суспензию фага наносили на лист фильтровальной бумаги, высушивали при -190°С и затем элюировали водой. Как выход, так и инфекционность фага в этом опыте полностью совпадают с соответствующими величинами для того же количества препарата, подвергнутого мечению. Таким образом, потери обусловлены неполной десорбцией фага с бумаги и снижением его инфекционности в процессе нанесения фага на бумагу и высушивания, а не действием на фаг термически активированного трития или радиолизом. Молярная радиоактивность меченого нуклеопротеида (20—50 Ки/ммоль) вполне достаточна для его использования в исследованиях репликации и трансляции вирусного генома *in vitro* и *in vivo*, определения степени разрушения вириона в различных условиях и т. д.

По данным электрофореза (после разрушения меченого бактериофага нагреванием в 7 М мочеvine с 1% додецилсульфата натрия), при взаимодействии фага MS2 с тритием не происходит расщепления или агрегации ни РНК, ни белка. Этим же методом для [³H]фага определено соотношение радиоактивности в РНК и белке оболочки (~1:3). Распределение радиоактивности между компонентами вириона представляет особый интерес, поскольку в веществе с плотностью, близкой к 1, длина свободного пробега атома ³H, активированного в данных условиях, не превышает 0,5 нм [10] и, таким образом, по локализации трития можно судить о степени экспонированности отдельных молекул и их фрагментов в составе комплексов биополимеров. Диаметр молекулы белка оболочки фага MS2 составляет ~10 нм [9], поэтому включение значительной части трития (~25%) во внутрифаговую РНК свидетельствует о том, что капсид не представляет собой сплошного слоя и между молекулами белка остается достаточно «пор», позволяющих активированным атомам трития достигать РНК в составе вириона.

Экспериментальная часть

Все эксперименты по получению меченого фага действием радиоактивного трития проводили на установке, описанной ранее [1]. Фаг MS2 получали по известной методике [11].

Раствор фага в 2 мл дистиллированной воды равномерно наносили с помощью микропипетки на предварительно промытую дистиллированной водой и тщательно высушенную подложку (фильтровальная бумага ФНС, СССР, 220 × 100 нм), которой выстилали стенки реакционного сосуда. Сосуд охлаждали жидким азотом, вакуумировали до 0,1 Па, заполняли 1,11 ГБк (30 мКи) ³H₂ и на вольфрамовую нить, расположенную по оси сосуда, подавали напряжение, нагревая ее при 2000 К в тече-

ше 30 с. После откачивания избыточного трития и заполнения сосуда воздухом полученный меченый фаг смывали с подложки дистиллированной водой (3 × 30 мл), контролируя каждую порцию элюата на сцинтилляционном счетчике LS 7000 (Beckman, Австрия). Объединенный элюат освобождали от частичек бумаги центрифугированием (10 мин, 4000 об./мин) и подвергали гель-фильтрации в воде на сефадексе G-25 для удаления лабильно связанного трития и низкомолекулярных тритийсодержащих примесей. Выход фага (в свободном объеме 2 мл) контролировали спектрофотометрически. Полученный препарат хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (~5 мл) в 0,3 М NaCl. Первые 8 мл элюата содержат практически всю нанесенную оптическую плотность и радиоактивность (остаточная радиоактивность на сорбенте не превышает 500 имп./мин). Инфекционность выделенного таким образом фага MS2 определяли методом агаровых слоев. В контрольный эксперимент брали такую же порцию фага и проводили все стадии, за исключением напуска газообразного трития.

Результаты опыта по введению метки и соответствующего контрольного опыта приведены в таблице. В других (не вошедших в таблицу) опытах по введению метки количество использованного газообразного трития составляло 30—100 мКи, а полученные меченые препараты имели удельную радиоактивность 20—50 Ки/ммоль.

Тритированный фаг диссоциировали нагреванием до 60° С (7 М мочевины с 1% додецилсульфатом натрия, 15 мин) и для определения степени деградации и (или) ассоциации РНК и белка и распределения в них радиоактивности проводили электрофорез в полиакриламидном геле (4% для РНК и 10% для белка, трис-боратный буфер, рН 8,3). После радиоавтографии участки геля, обнаруживающие радиоактивность, вырезали и просчитывали на сцинтилляционном счетчике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шишков А. В., Нейман Л. А., Смоляков В. С. Успехи химии, 1984, т. 53, № 7, с. 1125—1151.
2. Турчинский М. Ф., Антропова Л. П., Нейман Л. А. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 7, с. 948—952.
3. Каширин И. А., Гедрович А. В., Шишков А. В., Каграманова В. А., Баратова Л. А. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 11, с. 1531—1534.
4. Друца В. Л., Соколова И. И., Шабарова З. А. Молекулярн. биология, 1974, т. 8, № 6, с. 921—926.
5. Gamble R. C., Schimmel P. R. Proc Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, № 4, p. 1356—1360.
6. Neiman L. A., Antropova L. P., Turchinsky M. F., Zalesskaya M. A., Abdurashidova G. G., Budowsky E. I. 10th Radiochemical Conference. Abstract of Papers, Mariánské Lázně, Czechoslovakia, 1982, p. 102.
7. Нейман Л. А., Смоляков В. С., Антропова Л. П. В кн.: Органические соединения, меченные радиоактивными изотопами. М.: ЦНИИатоминформ, 1982, ч. 1, с. 32—42.
8. Нейман Л. А., Оноприенко В. В., Смоляков В. С., Соифер В. С., Третьякова С. Ю., Хозлов А. С. Биоорг. химия, 1984, т. 10, № 1, с. 116—120.
9. Грен Э. Я. Регуляторные механизмы репликации РНК-содержащих биополимеров. Рига: Зинатне, 1974, с. 9—43.
10. Вольнская А. В., Скрипкин А. Ю., Шишков А. В., Гольданский В. И. Докл. АН СССР, 1982, т. 266, № 4, с. 871—874.
11. Rogerson D. L., Rushizky G. W. Analyt. Biochem., 1975, v. 67, № 2, p. 675—678.

Поступила в редакцию
3.XII.1985

TRITIUM LABELING OF PHAGE MS 2 RNA AND PROTEIN

NEIMAN L. A., ANTROPOVA L. P., ZALESSKAYA M. A., BUDOWSKY E. I.

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

Thermal activation of tritium gas is used for labeling of the nucleoprotein, phage MS 2. The obtained preparation of tritiated phage has a specific radioactivity of 20—50 Ci/mmole, is considerably infectious and appears suitable for a wide range of studies. The radioactivity is distributed between intraphage RNA and phage outer protein (~ 1 : 3 ratio). Consequently, phage capsid is porous and sufficiently permeable for activated tritium atoms.