



УДК 577.217.33.543.544.4

© 1990 г.

*В.Ф. Зарытова, Г.Г. Карпова, Д.А. Мундус,
И.Г. Шишкина*

**ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ тРНК ИЗ
ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА, ОСНОВАННЫЙ НА МЕТОДЕ АФФИННОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ. ВЫДЕЛЕНИЕ ВЫСОКООБОГАЩЕННОГО
ПРЕПАРАТА Phe-тРНК^{Phe}**

Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР

Предложен эффективный подход к получению обогащенных индивидуальных тРНК из эукариотических источников, основанный на аффинной хроматографии. Сначала с использованием сорбента с присоединенным олигонуклеотидом рTGGT был получен препарат, содержащий суммарную тРНК с нативными CCA-концевыми последовательностями. Затем с использованием сорбента с иммобилизованным олигонуклеотидом рTTCAG, комплементарным участку антикодоновой петли тРНК^{Phe}, был получен высокообогащенный (не менее 1000 пмоль/ОЕ₂₆₀) препарат тРНК^{Phe}.

В связи с растущим интересом исследователей в области биоорганической химии и молекулярной биологии к изучению механизма биосинтеза белка млекопитающих, и прежде всего человека, возникает необходимость получения из этих объектов функционально активных индивидуальных компонентов трансляции, в том числе тРНК. Практически единственным нормальным органом человека, легко доступным в больших количествах, является послеродовая плацента, обладающая, однако, высоким уровнем РНКазной активности. Тем не менее описан метод выделения суммарной тРНК из плаценты человека в граммовых количествах с акценторной активностью по фенилаланину 12 пмоль/ОЕ₂₆₀ [1] и предложен подход к выделению индивидуальных тРНК, основанный на традиционном фракционировании суммарного препарата тРНК на ВД-целлюлозе* в сочетании с другими хроматографическими процедурами, например в системе RPC-5 [2]. (Система RPC-5, в которой проводили наработку различных индивидуальных тРНК в больших количествах, в настоящее время практически недоступна.)

Как следует из данных работы [1], даже при применении соответствующих мер предосторожности против деградации тРНК в процессе выделения (использование натрий-ацетатного буфера с рН 4,5 и гомогенизация полуразмороженной ткани для сведения к минимуму действия РНКаз) довольно трудно получить препарат тРНК, обладающий высокой функциональной активностью. Кроме того, чтобы получить индивидуальные эукариотические тРНК, для каждого вида тРНК нужно подбирать оптимальное сочетание методов, характеризующихся многостадийностью и значительными временными затратами. Как правило, после первоначального фракционирования на ВД-целлюлозе необходима одна или, чаще, несколько обращенно-фазовых хроматографий.

Целью настоящей работы стала разработка нового подхода к выделению индивидуальных тРНК из плаценты человека, основанного на методе аффинной хроматографии. Предложенный метод позволяет в одну стадию

*ВД-целлюлоза — бензоил-DEAE-целлюлоза.

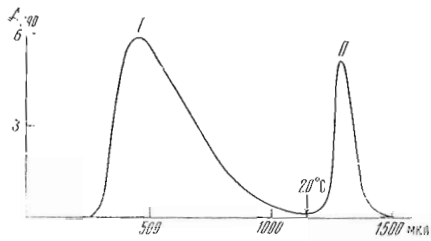


Рис. 1

Рис. 1. Профиль аффинной хроматографии 25 OE_{260} сырого препарата суммарной тРНК на TG GT-сорбенте. Объем колонки 1 мл, емкость сорбента 300 OE_{260} /г, скорость элюции 50 мкл/мин. После нанесения препарата подачу элюента прекращали на 20 мин. I — полинуклеотидный материал, соответствующий суммарной тРНК, обедненной тРНК^{Phe}, II — полинуклеотидный материал, обогащенный тРНК_{ССА}

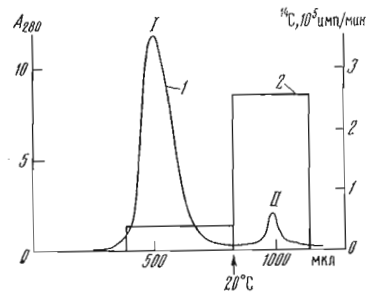


Рис. 2

Рис. 2. Профиль аффинной хроматографии 10 OE_{260} [¹⁴C]Phe-тРНК_{ССА} (см. текст) на TTCAG-сорбенте. Объем колонки 600 мкл, емкость сорбента 300 OE_{260} /г, скорость элюции 50 мкл/мин. После нанесения препарата подачу элюента прекращали на 20 мин. I — полинуклеотидный материал, соответствующий суммарной тРНК, обедненной тРНК^{Phe}, II — препарат тРНК, обогащенный тРНК^{Phe}. I — A_{280} , 2 — радиоактивность

получить высокообогащенный препарат тРНК исходя из препарата суммарной тРНК с нативными ССА-концами.

Сырой препарат тРНК из плаценты человека получали по модифицированной методике [1]. Для очистки от молекул тРНК, лишенных АССА-последовательности и неспособных образовывать комплементарный комплекс с олигонуклеотидом рТGGT, препарат фракционировали на сорбенте с иммобилизованным тетрапентануклеотидом рТGGT (в дальнейшем TG GT-сорбент). Для этого сырой препарат суммарной тРНК (25 OE_{260}), обладающий акцепторной активностью 15—25 пмоль/ OE_{260} по фенилаланину, растворяли в буфере связывания (1 М NaCl, 10 мМ MgCl₂, 20 мМ NaOAc, pH 6,5) и наносили на термостатированную колонку при 0° С. После элюции этим же буфером не связавшегося при 0° С материала (фракция I, рис. 1) температуру колонки повышали до 20° С и элюировали фракцию II (тРНК_{ССА}) водой (рис. 1). Фракции осаждали 2,5 объемами этанола, осадки собирали центрифугированием, высушивали, растворяли в буфере для аминоацилирования и определяли акцепторную активность полученного препарата тРНК по фенилаланину. Она составляла ~1 и 50—100 пмоль/ OE_{260} для фракций I и II соответственно.

Для получения высокообогащенного препарата по тРНК^{Phe} использовали сорбент (TTCAG-сорбент) с иммобилизованным пентадезоксирибонуклеотидом рTTCAG, комплементарным участку 32—36 антикодоновой петли тРНК^{Phe} [3]. Для аффинной хроматографии на TTCAG-сорбенте 10 OE_{260} тРНК_{ССА}, наработанных с помощью трех хроматографий на TG GT-сорбенте, предварительно аминоацилировали [¹⁴C]Phe и аминоацилированный препарат выделяли хроматографией на DEAE-целлюлозе. Аффинную хроматографию на TTCAG-сорбенте проводили так же, как на TG GT-сорбенте (рис. 2).

При использовании TTCAG-сорбента, содержащего 300 OE_{260} пентануклеотида на 1 г сорбента, в условиях образования стабильного комплекса (0° С, 1 М NaCl, 10 мМ MgCl₂, 20 мМ NaOAc, pH 6,5 [4]) на колонке задерживалось 80% [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} (рис. 2). Если же емкость сорбента составляла 50 OE_{260} /г, то в тех же условиях на такой же колонке задерживалось 17% [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe}. Из этих данных мы попытались оценить K_{ac} тРНК и пентануклеотида в использованных условиях. Учитывая, что емкость сорбента 300 OE_{260} /г соответствует концентрации пентануклеотида в растворе порядка $4 \cdot 10^{-3}$ М, имеем значение $K_{ac} \sim 10^3$ М⁻¹. Скорее всего, в этих условиях образующийся комплекс содержит четыре пары оснований [4], а остаток гуанина на 3'-конце пентануклеотида не

Препарат тРНК	Выход тРНК, ОЕ ₂₆₀	Количество фенилаланина (нмоль) в расчете на 1 ОЕ ₂₆₀ препарата тРНК
Суммарный тРНК	600	15–25
тРНК _{ССА}	80	50–100
тРНК ^{Phe}	3–5	1000

образует водородных связей с С³² тРНК^{Phe} вследствие стерических затруднений [5].

Таким образом, даже при низких значениях константы ассоциации Phe-тРНК^{Phe} с иммобилизованным на сорбенте олигонуклеотидом удается получить высокообогащенный препарат тРНК^{Phe}.

Можно надеяться, что предложенный подход, включающий в себя две стадии аффинной хроматографии (одна на TGGT-сорбенте и на сорбентах с ковалентно связанными олигонуклеотидами, способными образовывать комплементарные комплексы с тРНК), может быть использован для выделения многих высокообогащенных аминоксил-тРНК. Процедура выделения индивидуальной тРНК из сырого препарата суммарной тРНК, включающая в себя аффинную хроматографию на TGGT-сорбенте, осаждение тРНК_{ССА} этанолом с последующим ее аминокислотированием и выделением хроматографией на DEAE-целлюлозе и аффинную хроматографию на TTСAG-сорбенте, занимала около 4 ч. Необходимо отметить, что сорбенты с иммобилизованными олигонуклеотидами могут быть использованы многократно. В процессе одной хроматографии на TTСAG-сорбенте на колонке объемом 600 мкл при нанесении 20–50 ОЕ₂₆₀ тРНК_{ССА} может быть получено 2–3 ОЕ₂₆₀ тРНК^{Phe} с акцепторной активностью не менее 1000 пмоль/ОЕ₂₆₀, что сравнимо с акцепторной активностью коммерческих препаратов индивидуальных тРНК^{Phe} из *E. coli* и дрожжей фирм Sigma и Boehringer Mannheim.

Экспериментальная часть

В работе использовали [¹⁴C]фенилаланин (318 мКи/ммоль, ЧСФР). Фенилаланил-тРНК-синтетаза *E. coli* (КФ 6.1.1.20), 85% чистоты по данным электрофореза в ПААГ, была любезно предоставлена В. Н. Анкиловой (НИБХ СО АН СССР). Аминокислотирование тРНК и выделение аминокислотированных препаратов хроматографией на DEAE-целлюлозе проводили как описано в работе [6].

В работе использованы реактивы квалификации х.ч. или ос.ч., за исключением фенола марки ч.

Иммобилизацию олигонуклеотидов рTGGT и рTTСAG, синтезированных триэфирным методом в растворе [7], проводили реакцией NH₂-групп полимера полисил-СА, полученного по методике [8], с активированным по 5'-фосфату [9] олигонуклеотидом. Емкость сорбентов по иммобилизованному олигонуклеотиду составляла 50 или 300 ОЕ₂₆₀/г.

Препарат суммарной тРНК из плаценты человека получали по модифицированной методике [1] из 400 г плаценты, замороженной в жидком азоте и измельченной на гомогенизаторе (конструкция НИБХ СО АН СССР). Измельченную замороженную ткань перемешивали 30 мин с 400 мл 90% фенола, насыщенного 0,14 М NaOAc, pH 4,5 (АН). Водную фазу, отделенную центрифугированием (45 мин при 12 000 об/мин), экстрагировали 0,5 объемами 90% фенола и затем наносили на 150–200 мл суспензии DEAE-целлюлозы, промытой АН. Колонку промывали АН до A₂₆₀ 0,1 в элюате, затем 0,3 М NaCl в АН до A₂₆₀ 0,1 и фракцию суммарной тРНК элюировали 300 мл 1 М NaCl в АН. После осаждения этанолом осадок суспендировали в 200 мл 1 М NaCl, центрифугировали (20 мин при 6000 об/мин), супернатант отбирали, осадок снова экстрагировали 1 М NaCl, экстракт объединяли и нуклеотидный материал осаж-

дали этанолом. Полученный сырой препарат суммарной тРНК далее очищали на TGGT-сорбенте (рис. 1) и TTCAG-сорбенте (рис. 2) на хроматографе «Милихром» (СССР).

Выход тРНК и акцепторная активность по фенилаланину на каждой стадии выделения представлены в таблице.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roe B. A. // Nucl. Acids Res. 1975. V. 2. № 1. P. 21—42.
2. Roe B. A., Marcu K., Dudock B. S. // Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 319. № 1. P. 25—36.
3. Roe B. A., Anandaraj M. P. J. S., Chia I. S. Y., Randerath E., Gupta R. C., Randerath K. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1975. V. 66. № 4. P. 1097—1106.
4. Miller P. S., Barrot J. C., Ts'o P. O. P. // Biochemistry. 1974. V. 13. № 24. P. 4887.
5. Baumann U., Lehmann U., Schweltnus K., van Boom J. H., Kuhn H. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 170. № 1/2. P. 267—272.
6. Бабкина Г. Т., Карпова Г. Г., Матасова Н. Б. // Молекулярн. биология. 1984. Т. 18. Вып. 5. С. 1287—1296.
7. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. // Биооргани. химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 516—521.
8. Истребов С. И., Попов С. Г. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 5. С. 661—669.
9. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская А. М. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 475—481.

Поступила в редакцию
5 IX.1989

V. F. ZARYTOVA, G. G. KARPOVA, D. A. MUNDUS, I. G. SHISHKINA

APPROACH TO ISOLATION OF INDIVIDUAL tRNAs FROM HUMAN PLACENTA BASED ON AFFINITY CHROMATOGRAPHY. ISOLATION OF HIGHLY PURIFIED Phe-tRNA^{Phe}

Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Academy of Sciences of the USSR

A new approach to isolation of individual tRNAs from eukaryotes based on affinity chromatography is suggested. At first, using a sorbent with oligonucleotide pTGGT attached, the total tRNA with native CCA-ends was obtained. Then by means of a sorbent with oligonucleotide pTTCAG immobilized, which is complementary to a part of the tRNA^{Phe} anticodon loop, tRNA^{Phe} with the acceptor activity > 1000 pmole/unit was isolated.